



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**APLIKACE PŘÍRODNÍCH ANTIMYKOTIK DO  
HYGIENICKÝCH GELŮ**

APPLICATION OF NATURAL ANTIBIOTICS COMPONENTS IN HYGIENIC GELS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Veronika Kubišová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

**BRNO 2020**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1520/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Veronika Kubišová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Aplikace přírodních antimykotik do hygienických gelů

### Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Příprava a charakterizace vybraných rostlinných extraktů
- 2) Stanovení antimykotické aktivity připravených extraktů ve volné i enkapsulované formě a srovnání jejich účinku s antimykotickým léčivem
- 3) Návrh a testování antimykotického přípravku s obsahem přírodní antimykotické složky

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Veronika Kubišová  
student(ka)

-----  
Ing. Petra Matoušková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci gelů s obsahem přírodní složky vykazující antimykotický účinek.

Součástí této práce bylo zpracování rešerše, která byla zaměřena na popis povrchových a systémových mykotických onemocnění, antimykotických léčiv a rostlinných produktů s potenciálním antimykotickým účinkem. Dále byly popsány biologicky aktivní látky nacházející se ve vybraných rostlinách. Rovněž byly popsány a charakterizovány liposomové částice, které byly součástí experimentální části. Protože předmětem této bakalářské práce byla příprava antimykotického gelu, byla popsána základní charakteristika gelů, jakožto systémů schopných dodávání léčiva. Nebyly opomenuty popisy základních metod pro stanovení aktivních látek a antimykotické aktivity.

V rámci experimentální části byly z vybraných rostlin připraveny tři druhy extraktů (vodné, ethanolové a lipidické), které byly následně charakterizovány. Také byly všechny druhy připravených extraktů enkapsulovány do liposomových částic, u kterých byla následně stanovena enkapsulační účinnost, velikost a stabilita pomocí elektrokinetického potenciálu. Připravené extrakty ve volné i enkapsulované formě byly testovány z hlediska antimykotické aktivity, kdy testování bylo provedeno na kvasince *Candida glabrata*. Dále byl srovnán antimykotický účinek těchto přírodních látek s komerčně dostupným antimykotickým léčivem, kdy léčivo bylo rovněž testováno ve volné i enkapsulované formě. Extrakty, u kterých byl stanoven vyšší obsah aktivních látek a vyšší procentuální inhibiční účinnost buněk kvasinky *C. glabrata*, byly vybrány k inkorporaci do připravených gelů. Výsledkem práce jsou tedy gely na přírodní bázi, které by mohly sloužit k léčbě infekčního mykotického onemocnění. Příkladem připraveného gelu je gel s obsahem lipidického extraktu z měsíčku lékařského nebo s obsahem liposomů připravených z lipidického extraktu z tužebníku jilmového.

## **Klíčová slova**

mykózy, *Candida*, rostlinné extrakty, antimykotika, liposomy, gely

## **Abstract**

This bachelor thesis was focused on the preparation and characterization of gels containing a natural component exhibiting an antifungal effect.

A part of this work was the research, which was focused on the description of superficial and systemic fungal diseases, antifungal drugs and plant products with a potential antifungal effect. Moreover, biologically active substances found in selected plants was described. Liposome particles that were part of the experimental part were also described and characterized. Considering the subject of this thesis was the preparation of antifungal gel, the basic characteristics of gels such as their drug delivery systems were described. Descriptions of basic methods for the determination of active substances and antifungal activity were not omitted.

In the experimental part, three types of extracts (aqueous, ethanolic and lipidic) were prepared from selected plants, which were subsequently characterized. Also, all kinds of prepared extracts were encapsulated into liposome particles, in which encapsulation efficiency, size and stability by electrokinetic potential were subsequently determined. Prepared extracts in free and encapsulated form were tested for antifungal activity, when testing was performed on *Candida glabrata* yeast. Moreover, the antimycotic effect of these natural substances was compared with a commercially available antifungal drug, where the drug was also tested in free and encapsulated form. Extracts in which higher active compound content and higher percent inhibitory activity of *C. glabrata* cells were determined were selected for incorporation into the prepared gels. The result of this work are natural-based gels that could be used to treat infectious fungal diseases. An example of a prepared gel is a gel containing a lipidic extract of marigold or containing liposomes prepared from a lipidic extract of elm pincushion.

## **Keywords**

mycoses, *Candida*, plant extracts, antimycotics, liposomes, gels

KUBIŠOVÁ, Veronika. *Aplikace přírodních antimykotik do hygienických gelů*. Brno, 2020. 49 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří vedoucí této bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady potřebné pro vypracování bakalářské práce. Velký dík patří rovněž Ing. Marii Vysoké za její přátelský přístup, ochotu, pomoc a čas, který mi věnovala při řešení experimentální části. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině za umožnění studia a velkou podporu.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	Mykotická onemocnění .....	10
2.1.1	Povrchové mykózy .....	10
2.1.2	Systémové mykózy .....	11
2.2	Antimykotika .....	11
2.2.1	Imidazolová antimykotika .....	11
2.2.2	Triazolová antimykotika .....	12
2.2.3	Poylenová antimykotika .....	12
2.2.4	Ostatní systémová antimykotika .....	13
2.3	Přírodní rostlinné produkty s potenciálním antimykotickým účinkem .....	14
2.3.1	Měsíček lékařský .....	14
2.3.2	Třapatka nachová .....	14
2.3.3	Tužebník jilmový .....	15
2.3.4	Vilcacora .....	15
2.4	Účinné látky v extraktech .....	15
2.4.1	Antioxidanty .....	15
2.4.2	Flavonoidy .....	15
2.4.3	Polyfenoly .....	16
2.5	Metody stanovení antimykotické aktivity .....	16
2.5.1	Difuzní metoda .....	16
2.5.2	Diluční metoda .....	16
2.6	Enkapsulace účinných látek .....	17
2.7	Liposomové částice .....	17
2.7.2	Klasifikace liposomů .....	18
2.7.3	Metody přípravy liposomů .....	18
2.8	Metody využívané k charakterizaci liposomů a enkapsulovaných látek .....	19
2.8.1	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	19
2.8.2	Stanovení stability částic pomocí analýzy zeta potenciálu .....	20
2.8.3	Dynamický rozptyl světla .....	20
2.9	Hydrogely .....	20
2.9.1	Klasifikace hydrogelů .....	21

3	CÍL PRÁCE .....	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
4.1	Použité mikroorganismy pro stanovení antimykotické aktivity .....	23
4.2	Použité chemikálie .....	23
4.2.1	Použité chemikálie na přípravu extraktů.....	23
4.2.2	Použité chemikálie na charakterizaci extraktů.....	23
4.2.3	Použité chemikálie na kultivaci kvasinky <i>Candida glabrata</i> .....	23
4.2.4	Použitá chemikálie jako standard.....	23
4.2.5	Použité chemikálie na přípravu částic.....	23
4.2.6	Použité chemikálie na přípravu gelu.....	23
4.3	Použité přírodní materiály .....	23
4.4	Přístroje a pomůcky .....	24
4.5	Příprava extraktů .....	24
4.5.1	Příprava vodných extraktů .....	24
4.5.2	Příprava ethanolových extraktů .....	24
4.5.3	Příprava lipidických extraktů.....	24
4.6	Charakterizace extraktů .....	25
4.6.1	Spektrofotometrické stanovení celkových fenolických látek .....	25
4.6.2	Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů.....	25
4.6.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS.....	26
4.7	Příprava liposomových částic.....	26
4.7.1	Příprava liposomů z vodných extraktů .....	26
4.7.2	Příprava liposomů z ethanolových extraktů.....	26
4.7.3	Příprava liposomů z lipidických extraktů .....	26
4.7.4	Příprava liposomů s komerčně dostupným léčivem .....	27
4.8	Charakterizace liposomových částic .....	27
4.8.1	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	27
4.8.2	Stanovení velikosti a distribuce částic .....	27
4.8.3	Stanovení stability částic.....	27
4.9	Příprava výsledného produktu.....	28
4.10	Testování antimykotické aktivity .....	29
4.10.1	Příprava živného média a kultivace kvasinky <i>Candida glabrata</i> .....	29
4.10.2	Testování antimykotické aktivity diluční metodou .....	29

5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	30
5.1	Všeobecná charakteristika extraktů .....	30
5.1.1	Celkový obsah fenolických látek v jednotlivých extraktech .....	30
5.1.2	Celkový obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech.....	31
5.1.3	Celková antioxidační aktivita jednotlivých extraktů .....	33
5.2	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	34
5.3	Stanovení velikosti liposomů .....	35
5.4	Stanovení stability liposomů .....	37
5.5	Testování antimykotické aktivity .....	37
5.5.1	Testování antimykotické aktivity připravených extraktů.....	38
5.5.2	Testování antimykotické aktivity připravených částic .....	39
5.6	Testování antimykotické aktivity komerčně dostupného léčiva .....	40
5.7	Testování antimykotické aktivity výsledného produktu.....	41
6	ZÁVĚR .....	42
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	44
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	49



# 1 ÚVOD

Infekční onemocnění jsou závažným problémem dnešní doby, a to i přes výrazný pokrok v medicíně a neustálý rozvoj nových léčebných postupů a léčiv. Mykózy patří mezi infekční onemocnění způsobené mikroorganismy – plísněmi, jejichž význam a závažnost neustále narůstá. Rozdělujeme je na povrchové a invazivní. Povrchové mykózy napadají kůži a sliznice, mykózy orgánové pronikají do jednotlivých orgánů. Při postižení většího počtu orgánů, celého organismu nebo při zachycení plísni v krvi, jsou tato mykotická onemocnění spolu s invazivními mykózami označována jako systémová. Systémové infekce jsou poněkud vzácnější, ale za to mnohem závažnější. Invazivní mykózy postihují zejména pacienty s porušením obranyschopnosti organismu. Mykotická onemocnění jsou také nazývána podle vyvolavatele. Příkladem je onemocnění kandidóza, které je vyvoláno kvasinkami rodu *Candida*.

K léčbě mykóz jsou užívána antimykotika neboli látky s protizánětlivým a antifungálním charakterem. Přestože na trh přichází stále nová antimykotika a syntetické prostředky ničící plísně, dochází také k podstatnému zvýšení rezistencí plísňových mikroorganismů na tato léčiva. Dalšími problémy těchto syntetických přípravků jsou jejich vedlejší účinky, které se mohou projevovat jako nevolnost, bolesti hlavy, toxicita jater nebo dokonce poškození ledvin. Proto je v posledních letech věnována velká pozornost přírodním látkám s antimykotickým charakterem. Využívány jsou především rostliny s vyšším obsahem aktivních látek, jako jsou polyfenoly, flavonoidy a antioxidanty. Tyto bioaktivní látky jsou totiž nositeli antimykotického a protizánětlivého účinku.

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci extraktů z přírodních antimykotických složek. Výsledkem práce je gel s obsahem této složky, který vykazuje účinek proti mykotickým onemocněním.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mykotická onemocnění

Mykotická onemocnění (mykózy) jsou pravá infekční onemocnění vyvolána především mikromycetami řadícími se v absolutní převaze mezi houby vřeckaté nebo imperfektní a výjimečně mezi houby stopkovýtrusé. Mikromycety jsou eukaryotní rostlinné mikroorganismy, které mohou být jak saprofytické, tak parazitující na jiných organismech. Buňky těchto organismů obsahují pravé jádro s jadernou membránou. V cytoplazmě buněk se nachází mitochondrie a jiné organely. Cytoplazmatická membrána je složena z lipidů, glykoproteinů a také sterolů. Ve struktuře buněčné membrány nacházíme chitin, glukany nebo manany [1].

Kritéria dělení mykóz jsou různá, jako nejjednodušší se jeví rozdělení na povrchové a hluboké – orgánové a systémové. Podjednotkami povrchových mykóz jsou dermatofytózy, černá a bílá píedra, tinea nigra, kožní kandidózy a jiná další onemocnění. Příkladem mykóz orgánových a systémových je aspergilóza, podkožní a nosní fykomykóza a mukormykóza, blastomykóza, kandidóza a spousta dalších onemocnění. K nejčastějším infekcím, která jsou způsobena mikromycetami, patří kožní mykózy [1].

#### 2.1.1 Povrchové mykózy

Kožní (superficiální) mykózy jsou vyvolány parazitickými houbami, které se množí v keratinových vrstvách kůže. Mykotická infekce rovněž postihuje adnexy kůže, jako jsou vlasy a nehtové ploténky. Nezasahuje tedy do hlubších tkání [1, 2].

Nejčastějšími původci mykotické infekce jsou dermatofyty a kvasinky. Mezi dermatofyty řadíme např. *Trichophyton (T) mentagrophytes*, *T. rubrum* a *T. verrucosum*. U kvasinek jsou nejčastějšími zástupci kvasinky rodu *Candida (C)*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* a *C. Crusei*. Podle etiologie se povrchové mykózy dělí na kandidózy, dermatofytózy (tinea) a keratomykózy [2].

##### 2.1.1.1 Tinea

Infekce způsobené dermatofyty se běžně označují jako „tinea“. Názvy různých infekcí tinea jsou založeny na typu a místě infekce. Příkladem je tinea capitis, která se objevuje na pokožce hlavy. Tinea capitis se vyskytuje převážně u dětí. U dospělých jedinců je výskyt méně častý. Ženy bývají postihnuty tímto onemocněním více než muži, neboť vznik infekce má souvislost s hormonálními poruchami. Projevuje se tvorbou anulárních, ostře ohraničených útvarů, které mohou splývat. Je způsobena nejčastěji dermatofytem *Trychophyton mentagrophytes*. Dalším známým typem dermatofytózy je tinea barbae, která postihuje oblast vousů, obočí i řas. Mezi další známé typy tohoto onemocnění patří tinea corporis nebo tinea circinata, následována tinea cruris a tinea pedis [2, 3, 4].

##### 2.1.1.2 Keratomykóza

Pityriasis versicolor, známá také jako tinea versicolor, je infekce postihující stratum corneum kůže. Je charakterizována šupinatými, dyspigmentovanými nepravidelnými útvary. Nejčastěji se vyskytuje v oblasti trupu a na končetinách. Původcem tohoto onemocnění je kvasinka *Malassezia*, která je součástí normální kůže. Za určitých podmínek se tato komenzální kvasinka transformuje na vláknitou patogenní formu. Není obvyklá u dětí, tato nemoc většinou postihuje jedince nad dvacet let [5].

Pityriasis versicolor může být spojena s různými systémovými chorobami, jako je diabetes mellitus, Cushingův syndrom, imunosupresivní stavy a také s příjmem kortikosteroidů [5].

### **2.1.1.3 Kandidóza**

Invazivní infekce způsobená kvasinkami rodu *Candida* (*C*) je široce uznávána jako hlavní příčina vzniku různých nemocí a úmrtnosti. Mezi nejčastější patogenní kvasinky tohoto rodu řadíme kvasinku *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a *C. krusei*. Každý z těchto organismů má jedinečný virulentní potenciál, antifungální vnímavost a epidemiologii. Rod *Candida* je původcem nejenom kožních a slizničních mykóz, ale také mykóz systémových. Tyto kvasinky jsou původci významné infekce, která je označována jako invazivní kandidóza. Mezi predisponující faktory kandidózy jsou např. hormonální změny (těhotenství, diabetes mellitus a další endokrinní poruchy), příjem širokospektrálních antibiotik, která narušují bakteriální flóru a také celkové oslabení organismu při těžkém onemocnění [6, 7].

Nejčastějším klinickým projevem povrchové kandidózy je moučnivka (soor), která se vyznačuje bílými splývajícími povlaky na sliznici úst a na jazyku. Moučnivku pozorujeme nejčastěji u novorozenců a prakticky u všech případů AIDS. Druhou nejčastější kandidovou infekcí je vaginální kandidóza, kdy možným důvodem příčiny této infekce je nižší pH. Na kůži se kandidóza objevuje v místech vlhké zapádky, tj. pod prsy, v podpaží, v tříslech a mezi prsty. Kandidového původu může být také infekce nehtů (onychomykóza), která na rozdíl od onychomykózy vyvolané dermatofyty začíná zánětlivým zduřením nehtového valu [7].

### **2.1.2 Systémové mykózy**

Přestože povrchové mykózy patří mezi nejčastěji vyskytující se houbové infekce, systémové mykózy vyvolávají mnohem větší obavy, neboť jsou život ohrožující a jsou spojeny s vysokou mírou úmrtnosti. Tyto invazivní infekce mohou proniknout až hluboko do orgánů a projevují se zejména u pacientů s oslabeným imunitním systémem [8].

## **2.2 Antimykotika**

K léčbě mykotických onemocnění jsou používána antimykotika. Antimykotika jsou definována jako antibiotika nebo chemoterapeutika určená k léčbě lokálních i celkových infekcí, vyvolaných patogenními kvasinkovými mikroorganismy a plísněmi. Tato léčiva se dělí především dle způsobu použití, na látky pro místní nebo celkové použití. Z chemického hlediska, resp. chemické struktury, se antimykotika dělí do čtyř hlavních skupin, a to na imidazolová, polyenová, triazolová a ostatní systémová antimykotika [9].

### **2.2.1 Imidazolová antimykotika**

Antifungální spektrum azolových antimykotik je široké, zahrnuje dermatofyty (plísně postihující kůži) a původce systémových mykóz (rody *Candida*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Aspergillus* a *Sporothrix*). Principem azolů je inhibice enzymu, který se podílí na syntéze ergosterolu houbových mikroorganismů. Konkrétněji jeden z atomů dusíku, který je součástí azolového kruhu, se váže na hemovou skupinu enzymu (cytochromu P450), čímž pak dochází k inhibici přeměny lanosterolu na ergosterol [10].

### 2.2.1.1 Ketokonazol

Jedná se o antimykotikum řadící se do skupiny imidazolů. Je to léčivo, které se po perorálním podání dobře vstřebává z trávicího traktu. V organismu se intenzivně biotransformuje a následně vylučuje ve formě metabolitů. Toto antimykotikum se v současné době tolik nepoužívá, důvodem jsou jeho časté nežádoucí účinky. A rovněž inhibuje metabolismus jiných léčiv [9, 10].

### 2.2.1.2 Mikonazol

Mikonazol je dalším imidazolovým antimykotikem, které působí proti kožní kandidóze a vulvovaginitidě způsobené kvasinkou *C. albicans*. Je také vhodné k léčbě kožní infekce způsobené rody *Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton* [10].

## 2.2.2 Triazolová antimykotika

Itrakonazol je ve vodě nerozpustná triazolová sloučenina, která vykazuje antifungální aktivitu. Je-li podávána v terapeutických dávkách, vykazuje antimykotickou aktivitu proti blastomýkóze, histoplazmóze, sporotrichóze, kandidóze, onychomýkóze a dalším infekcím vyvolaných dermatofyty [10].

### 2.2.2.1 Flukonazol

Flukonazol je ve vodě nerozpustný fluorem substituovaný bistriazol s účinnou antimykotickou aktivitou. Flukonazol je primárně užíván k léčbě kryptokokové meningitidy, která se objevuje u pacientů s AIDS. Účinný je také při léčbě mukózní, orofaryngeální a jícnové kandidózy. Rovněž pomáhá pacientům, kteří trpí kokcidiovou meningitidou, blastomýkózou a histoplazmózou. Toto antimykotikum má ve srovnání s jinými azolovými antimykotiky menší nežádoucí účinky. Avšak může způsobovat problémy, jako je dysfunkce jater a hypokalémie. Flukonazol má menší inhibiční účinek na metabolismus jiných léčiv než ketokonazol [10].

### 2.2.2.2 Vorikonazol

Vorikonazol je triazolové léčivo, které je užíváno pacienty, trpícími plísníovými infekcemi, perorálně. Antimykotickou aktivitu vykazuje zvláště u druhů *Aspergillus* a *Candida*. Vorikonazol je derivát flukonazolu s vyšší antifungální aktivitou a specifitou. Vorikonazol je také vhodný k léčbě invazivní aspergilózy způsobené kvasinkou *Aspergillus terreus*, která je stále častěji pozorována jako patogen u pacientů s oslabenou imunitou. Mezi vedlejší účinky vorikonazolu patří erytematózní vyrážka, poruchy zraku, hepatotoxicita a bolesti hlavy. Je však považován za bezpečnější variantu antimykotika, ve srovnání s polyenovým léčivem amphotericinem B [10].

### 2.2.2.3 Posakonazol

Posakonazol je triazolové antimykotikum, které strukturně připomíná itraconazol. Antifungální spektrum posakonazolu je podobné jako u vorikonazolu. Posakonazol působí proti široké škále kvasinek rodu *Candida* a je stejně účinný jako flukonazol proti orofaryngeální kandidóze. Tento lék však může způsobovat únavu, nevolnost a jaterní toxicitu [10].

## 2.2.3 Polyenová antimykotika

Polyenová antimykotika jsou neúčinnějšími širokospektrálními antimykotiky. Jde ale o značně toxická antimykotika (nefrotoxicita, neurotoxita), která působí jak celkově

(amfotericin B, ambison), tak lokálně (nystatin, pimarin), a to především na kvasinky a plísně. Polyenoly vazbou na ergosterol vytvářejí v buněčné membráně hub póry, kterými z buňky unikají ionty a jiné molekuly, čímž dochází k poškození daného mikroorganismu [9, 11].

#### **2.2.3.1 Amfotericin B**

Amfotericin B (amfoterní polyenový makrolid) je antifungální antibiotikum. Konvenční IV amfotericin B se používá k léčbě život ohrožujících plísňových infekcí, včetně aspergilózy, blastomykózy, kandidózy, kokcidiodomykózy, kryptokomykózy, histoplasmózy a zygomykózy [12].

Jak už bylo zmíněno, léčivo vykazuje antimykotickou aktivitu hlavně vazbou na steroly (např. ergosterol) v buněčné membráně hub. V důsledku vzniku této vazby buněčná membrána již nemůže sloužit jako selektivní bariéra a dochází tak k úniku intracelulárního obsahu. K buněčné smrti dochází částečně díky změně permeability membrány. Ale i jiné mechanismy mohou přispět k in vivo antimykotickým účinkům amfotericinu B proti některým mikroorganismům. Amfotericin B není in vitro účinný proti organismům, které ve svých buněčných membránách steroly nemají (např. bakterie) [12].

Vazba na steroly v savcích buňkách (např. erytrocyty, ledvinové buňky) může být příčinou některých toxicit, které jsou hlášeny při konvenční terapii amfotericinem B. Jednou z hlavních toxicit je neurotoxicita. Neurotoxicita se do určité míry vyskytuje u většiny pacientů, kteří jsou tímto přípravkem léčeni. Mezi nežádoucí účinky tohoto antimykotika patří snížená funkce ledvin a abnormalita funkcí ledvin, jako je azotémie, hypokalémie, renální tubulární acidóza a nefrokalcinóza [12].

#### **2.2.3.2 Natamycin**

Natamycin je účinný proti celé řadě hub, kvasinek, některým prvokům a řas. Nemá však antibakteriální aktivitu. Používá se pouze lokálně proti plísňovým infekcím kůže a sliznic. Natamycin se pacientům podává samostatně nebo ve spojení s neomycinem a hydrokortisonem či jinými steroidními látkami. Používá se také jako potravinářská přídatná látka, zejména jako antimykotikum na síry, mastné výrobky a víno, zabraňuje se tak tvorbě mykotoxinů [13].

### **2.2.4 Ostatní systémová antimykotika**

#### **2.2.4.1 Griseofulvin**

Tricyklické fungistatické antimykotikum, které je účinné proti dermatofytickým plísním. Griseofulvin nijak nepůsobí na kvasinky a bakterie. Ukládá se do buněk a pokožky a zabraňuje prorůstání plísňových vláken do hlubších partií kůže. Tam se při podávání tohoto léčiva vyvíjejí zdravé buňky, které postupně nahrazují povrchní infikovanou vrstvu, která se následně odlupuje. Pro úspěšnou terapii je nutné podávat griseofulvin až čtyři týdny. Z vedlejších účinků jsou časté bolesti hlavy, z vážnějších se někdy vyskytne přechodná leukopenie [9, 14].

#### **2.2.4.2 Flucytosin**

Tento pyrimidinový antimetabolit s fungicidními vlastnostmi má široké spektrum účinku, proniká do hlubších tkání i sekretů. Molekula flucytosinu je dobře rozpustná ve vodě, proto se

po perorálním podání velmi dobře a rychle vstřebává. Podává se zejména u generalizovaných kandidóz a kryptokóz [9, 15].

### 2.3 Přírodní rostlinné produkty s potenciálním antimykotickým účinkem

V posledních letech byl pozorován celosvětový nárůst plísňových infekcí a rovněž vzrostla odolnost některých druhů hub vůči různým fungicidům používaných v lékařské praxi. Různé vědecké studie popisují, že v přírodních zdrojích, jako jsou rostliny, hmyz, půdní a mořské mikroorganismy, se nachází řada molekul s antimykotickou aktivitou proti různým druhům hub s velkým klinickým významem pro člověka. Tyto látky by tedy mohly být alternativou pro vývoj a formulaci nových antimykotik [16].

V této kapitole jsou popsány vybrané potenciální zdroje molekul s antimykotickou aktivitou získaných z přírodních zdrojů.

#### 2.3.1 Měsíček lékařský

Měsíček lékařský (*Calendula officinalis* L.) je léčivá rostlina rodu *Calendula* z čeledi hvězdnicovitých. Je to jednoletá bylina (zřídka dvouletá), která je široce rozšířena ve Francii, Rakousku, Česku a spousty dalších zemí. Měsíček lékařský má dlouho historii, co se týče jeho užívání při léčbě zánětů a kožních ran. Tato rostlina má vřetenovitý kořen, a větvenou lodyhu dosahující výšky 50 cm. Spodní listy jsou kopist'ovité, horní téměř kopinaté nebo eliptické, až 12 cm dlouhé. Větve jsou zpravidla zakončeny žlutým (až oranžovým) květem s dvouřadým zákrovem [17, 18].

Užívanou částí byliny je květ, který obsahuje mnoho účinných látek, zejména silice, saponiny, asi 19 % hořčiny kalendenu a kalendulinu, karotenoidy, kyselinu salicylovou aj. Hlavním nositelem účinku jsou polyacetylenové sloučeniny. Příznivé působení měsíčku je dáno součinností silice a xanthofylu za působení kalendulinu a slizových látek. Měsíček má podobné účinky jako arnika. Působí spazmolyticky, povzbuzuje sekreci žluči, zastavuje růst bakterií. Jeho zevní aplikací dochází k urychlení hojení ran se zánětlivým okolím a užívá se i proti plísním a při bércových vředech [18].

Antimykotická účinnost u květů této rostliny byla prokázána několika vědeckými studiemi. Bylo také zjištěno, že zejména olejové extrakty měsíčku působí antimykoticky proti kvasinkám rodu *Candida* [19].

#### 2.3.2 Třapatka nachová

Třapatka nachová (*Echinacea purpurea* L.) je jednou z nejdůležitějších a nejznámějších léčivých rostlin na světě. Patří do čeledi *Asteraceae*. Jedná se o jednu z nejrozšířenějších léčivých rostlin tohoto druhu. Používá se hlavně k léčení infekčních onemocnění horních a dolních dýchacích cest. Je také vhodná k léčbě bolesti střev, chronické artritidy a kožních poruch [20].

V některých vědeckých studiích byla testována antioxidační aktivita této rostliny. Bylo zjištěno, že testy prováděné u extraktu z kořene třapatky nachové prokázaly antioxidační aktivitu, kterou lze připsat obsahu fenolických látek a kyseliny cichorové obsažených v rostlině. Kromě antioxidačních testů se vědecké studie zmiňují o antimikrobiální aktivitě této rostliny. Byla prokázána výrazná inhibice růstu kmene *Candida albicans* [21].

### 2.3.3 Tužebník jilmový

Tužebník jilmový je léčivá rostlina pocházející z Evropy. Tradičně se používá k léčbě různých onemocnění kvůli jejím antipyretickým, analgetickým a protizánětlivým vlastnostem. Je to vytrvalá, vonící bylina až 150 cm vysoká s článkovaným plazivým oddenkem a lodyhou přímou, nahoře větvenou. Listy mají na lici červený nádech, na rubu pak běloplstnatý. Nažloutlé bílé drobné květy jsou sestavena ve složitá, bohatá, vrcholíkovitá květenství [18, 22].

Všechny části rostliny, zvláště pak nať a květ, obsahují účinné látky, zejména glykosid gaultherin a spirein, flavony a silici (květy asi 0,2 %). Silice obsahuje salicylaldehyd a vonný methylsalicylát. Gaultherin se štěpí v salicylovou sloučeninu. Obsahové látky mají účinek slabě diuretický a rovněž diaforetický. Tužebník jilmový přispěl k vývoji aspirinu, kdy kyselina salicylová byla poprvé izolována právě z květů tužebníku jilmového. Má tedy vliv na snížení horečky [22].

### 2.3.4 Vilcacora

Vilcacora (*Uncaria tomentosa* L.), nazývána také jako kočičí dráp (Una de gato), je velká dřevitá réva z čeledi *Rubiaceae* pocházející z Amazonského deštného pralesa. Domorodé kmeny ji používají k léčení už po dobu 2000 let. Vilcacora obsahuje velké množství bioaktivních látek, proto je zajímavá z farmakologického a nutričního hlediska. Tato rostlina má silný imunostimulační, antioxidační a protizánětlivý účinek. Pestrou a bohatou stavbu této rostliny tvoří kromě jiného alkaloidy, glukosinoláty, flavonoidy, steroly, karboliny a polynenasycené mastné kyseliny [23, 24].

## 2.4 Účinné látky v extraktech

### 2.4.1 Antioxidanty

Volné radikály jsou molekuly s vysokou reaktivitou způsobenou obsahem nepárových elektronů v této molekule. Tyto radikály způsobují poškození nukleových kyselin, proteinů, sacharidů a lipidů, což je pak příčinou vzniku různých chorob, včetně předčasného stárnutí, rakoviny a aterosklerózy. Antioxidanty mohou tyto volné radikály vychytávat. Zabraňují tak poškození buněk, resp. snižují tzv. oxidační stres způsobený volnými radikály. A mají tak příznivý účinek na lidské zdraví [25].

Jako zdroje přírodních, a především bezpečných antioxidantů byly vyhodnoceny biologické zdroje, jako jsou léčivé rostliny, koření, zelenina a ovoce. Kromě rostlin jsou také mikroorganismy přírodním zdrojem bioaktivních sloučenin, které jsou využívány v lékařství, zemědělství a v mnoha průmyslových odvětvích [25].

Antioxidanty zahrnují řadu fotochemikálií, jako je vitamín C, vitamín E,  $\alpha$ - tokoferol,  $\beta$ -karoten a několik fenolických sloučenin. Míra antioxidační aktivity těchto fotochemikálií se liší v závislosti na jejich reaktivních skupinách. Například vitamín C obsahuje vyšší počet reaktivních hydroxylových skupin ve srovnání s vitamínem E [25].

### 2.4.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou důležitou třídou přírodních produktů, patří do třídy rostlinných sekundárních metabolitů mající polyfenolickou strukturu. Patří mezi nízkomolekulární fenolové sloučeniny. Hojně se vyskytují v ovoci, zelenině a některých nápojích. Mají různé příznivé biochemické a antioxidační účinky, které jsou spojeny s chorobami, jako je rakovina, Alzheimerova choroba

a ateroskleróza. Flavonoidy jsou spojovány s širokým spektrem účinků podporujících zdraví. Jsou nepostradatelnou součástí v mnoha farmaceutických a kosmetických aplikacích. Důvodem jsou jejich antioxidační, protizánětlivé, antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou spojené se schopností flavonoidů modulovat klíčové buněčné funkce enzymů. Je také známo, že jsou silnými inhibitory pro několik enzymů, příkladem je cyklooxygenáza a lipooxygenáza [26].

Flavonoidy jsou získávány v podobě rostlinných extraktů, které se nacházejí v několika částech rostlin. Jsou snadno rozpoznatelné jakožto květinové pigmenty. V rostlinách se syntetizují na konkrétních místech a jsou zodpovědné za jejich barvu a vůni. Flavonoidy chrání rostliny před různými biotickými a abiotickými stresy, působí také jako jedinečné UV filtry. Kromě rostlin se vyskytují také v čaji, kakau a víně, proto jsou označovány jako dietonické flavonoidy [26].

Mezi podskupiny flavonoidů patří: chalkony, flavony, flavonoly a isoflavony [26].

### **2.4.3 Polyfenoly**

Polyfenoly představují jedny z nejznámějších sekundárních rostlinných metabolitů, které se vyznačují jedinečnými bioaktivními vlastnostmi a mají příznivý vliv na člověka. Jsou to sloučeniny, které se strukturně velmi liší, přesto jsou nezbytné pro řadu rostlinných funkcí zodpovědných např. za nutriční vlastnosti potravin získaných s těchto rostlin [27]. Vědecké studie ukazují na jejich antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, které by mohly mít terapeutické účinky na kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní poruchy, rakovinu a obezitu [28].

## **2.5 Metody stanovení antimykotické aktivity**

Antimykotická aktivita přírodních extraktů může být detekována inhibicí hub a kvasinek způsobenou těmito extrakty. Metodika testování přírodních látek pro stanovení antifungální aktivity je variabilní. K detekci aktivity existuje několik metod, které se liší svou citlivostí a rovněž svým principem. Níže jsou uvedeny dvě hlavní metody stanovení antimykotické aktivity, metoda difuzní a diluční [29].

### **2.5.1 Difuzní metoda**

Difuzní disková metoda prováděná na agaru je metoda, která je jednoduchá a není potřeba vysokých nákladů. Tento test je založen na použití disků obsahujících roztoky testovaných látek. Testovaná sloučenina o známé koncentraci je v kontaktu s inokulem a průměr čiré zóny (inhibiční průměr) se měří na konci inkubační doby. Specifickou výhodou je použití malého objemu vzorku a možnost testování až šesti vzorků extraktů na misce proti jednomu mikroorganismu [29].

### **2.5.2 Diluční metoda**

Při dilučních metodách jsou testované látky smíchány s vhodným médiem, které bylo předem naočkováno kmenem daného mikroorganismu. Test může být proveden v kapalině i na pevném médiu, růst mikroorganismu lze měřit mnoha způsoby. Agarová diluční metoda definuje MIC jako nejnižší koncentraci, která je schopná inhibovat jakýkoli viditelný růst hub. Při diluční metodě prováděné v tekutinách (v bujónu) se využívá tvorby zákalu nebo se využívají redoxní indikátory. Zákal lze odhadnout vizuálně nebo přesněji pomocí spektrometrického stanovení. Testované vzorky, které nejsou zcela rozpuštěny, mohou rušit hodnoty změřeného zákalu, což



zdůrazňuje potřebu negativní kontroly. Diluční metoda také umožňuje stanovení toho, zda daná sloučenina nebo extrakt má fungicidní účinek při určité koncentraci [29].

## **2.6 Enkapsulace účinných látek**

Zapouzdření může být definováno jako proces zachycení jedné látky (účinné látky) v látce jiné. Většinou se jedná o léčiva, která bývají enkapsulována. Jejich zapouzdření v biologicky relevantních materiálech je slibným způsobem pro zlepšení jejich farmakologických a spotřebitelských vlastností. Léky v tradičních formách často vykazují určité nedostatky, které vážně omezují jejich široké využití v klinické praxi a způsobují tak nepříjemnosti pacientům při jejich užívání. Četné studie ukázaly, že enkapsulace léčiv v materiálech různé povahy mohou výrazně změnit vlastnosti léčiv a jejich chování v biologických médiích [30].

## **2.7 Liposomové částice**

Liposomy jsou malé umělé vezikuly kulovitěho tvaru, které lze vytvořit z přírodních netoxických fosfolipidů. Vzhledem k jejich velikosti a také hydrofobnímu a hydrofilnímu charakteru jsou liposomy slibnými systémy pro dodávání léčiv. Vlastnosti liposomů se výrazně liší podle složení lipidů, povrchového náboje, velikosti a způsobu přípravy. Výběr komponent dvojvrstvy rovněž určuje „tuhost“ a „tekutost“ této dvojvrstvy. Příkladem je příprava liposomů z nenasyčených druhů fosfatidylcholinu z přírodních zdrojů (fosfatidylcholin z vajec nebo sójových bobů), které poskytují mnohem větší propustnost a menší stabilitu dvojvrstvy, zatímco nasycené fosfolipidy s dlouhými acylovými řetězci udávají dvojvrstvě větší tuhost a spíše nepropustnost [31].

Fosfolipidy impulzivně vytvářejí uzavřené struktury, když jsou hydratovány ve vodných roztocích. Takové vezikuly, které mají jednu nebo více fosfolipidových dvouvrstvých membrán, mohou transportovat vodná nebo lipidová léčiva, v závislosti na povaze těchto léčiv. Liposomy jsou obecně definovány jako sférické vezikuly s velikostí částic od 30 nm do několika mikrometrů. Skládají se z jedné nebo více lipidových vrstev, kde amfifilní lipidy jsou orientovány svou polární částí na vnější stranu membrány, nepolární částí jsou obráceny proti sobě a představují tak hydrofobní vrstvu [31].

Liposomy se hojně používají jako nosiče molekul v mnoha odvětvích, a to díky jejich biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a schopnosti uvolňování zachycené látky na určitých cílech. Liposomální enkapsulační technologie má obrovské využití ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [31]. Liposomy se používají v kosmetickém průmyslu zejména k ochraně antioxidantů. Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole (viz. kapitola 2.4.1), antioxidanty hrají klíčovou roli v ochranně a udržování zdraví a jsou také nedílnou součástí kosmetických přípravků. Většina z nich je ale citlivá kvůli jejich malé stabilitě a nerozpustnosti. Použití liposomů k ochraně antioxidantů a celkové jejich použití v kosmetických přípravcích je jedním z nejúčinnějších řešení [32].

### **2.7.1.1 Cholesterol**

Cholesterol je klíčovou součástí membrány živočišných buněk. Je přítomen v různých poměrech na základě typu membrány a je známo, že modifikuje vlastnosti membrány mnoha důležitými způsoby. Cholesterol ovlivňuje mechanické vlastnosti membrán, zejména zvyšuje jejich mechanickou pevnost, resp. ovlivňuje elasticitu membrány. Je také klíčovou molekulou podílející se na tvorbě lipidových nanodomén, známých jako rafty, které se uplatňují v mnoha

buněčných procesech, jako je apoptóza, signalizace a diferenciace buněk. Rovněž bývá důležitou součástí liposomů schopných dodávání léčiv, kde reguluje fluiditu membrán [33].

Cholesterol je sloučenina řadící se mezi steroly. Jeho struktura sestává z hydrofobního, rovinného steroidního jádra, polární hydroxylové skupiny a krátkého uhlovodíkového řetězce. Společně s ostatními membránovými lipidy, je cholesterol amfipatická molekula, která obsahuje jak hydrofobní, tak (malou) hydrofilní část tvořenou hydroxylovou skupinou [34].

### **2.7.1.2 Lecitin**

Lecitin (fosfatidylcholin) je jednou z nejčastěji využívaných fosfolipidových sloučenin v biologických studiích. Lecitiny se především liší v závislosti na jejich původu a složení, včetně délek řetězců tvořených mastnými kyselinami. Lecitin sestává z polární a nepolární části, kdy nejčastější formou polární částí, která je označována jako „hlava“ sloučeniny, je cholinová skupina [35].

Lecitiny se nejčastěji používají jako amfoterní emulgátory. Podporují stabilní formu emulzí typu olej ve vodě a voda v oleji snížením povrchového napětí na rozhraní mezi nemísitelnými tekutinami. Slouží také jako smáčedla, kdy poskytují úplné smáčení mastných nebo hydrofilních prášků ve vodních systémech, tzn. mastné kyseliny jsou přitahovány k nepolárním částem a hydrofilní části molekul pak aktivně absorbují vodu a řídí hydrataci prášků. Lecitiny mohou také sloužit jako uvolňovací prostředky nebo modifikátory viskozity [36].

Lecitiny se přirozeně vyskytují v několika potravinách, včetně vaječných žloutků, sójových bobů a ořechů [37].

### **2.7.2 Klasifikace liposomů**

Velikost liposomů se může lišit, vezikuly se mohou pohybovat v rozmezí od 25 nm do 2 500 nm. Kromě toho mohou mít jednu nebo více dvouvrstvých membrán. Tyto odlišné parametry mohou mít vliv na množství zapouzdřeného léčiva. Na základě velikosti a počtu dvojrstev mohou být liposomy klasifikovány do dvou kategorií: multilamelární vezikuly (MLV) a unilamelární vezikuly. Unilamelární vezikuly lze také klasifikovat do dvou kategorií: velké unilamelární vezikuly (LUV) a malé unilamelární vezikuly (SUV). V unilamelárních liposomech má vezikula jednu fosfolipidovou dvojrstvu obklopující vodný roztok. V multilamelárních liposomech mají vezikuly strukturu cibule, resp. vytvoří se multilamelární struktura soustředěných fosfolipidových koulí, z několika unilamelárních váčků, které jsou odděleny vrstvami vody [31].

### **2.7.3 Metody přípravy liposomů**

Liposomy mohou být připraveny pomocí široké škály metod, které jsou založeny na kombinaci lipidů s vodným médiem, a které pak ovlivňují vlastnosti těchto připravených částic, jako je velikost, lamelarita a účinnost zapouzdření. Metody pro přípravu liposomů lze klasifikovat do dvou základních kategorií: konvenční (běžné) metody a metody vyžadující speciální vybavení. Metody přípravy liposomů většinou zahrnují tyto čtyři základní fáze: vysychání lipidů z organického rozpouštědla, dispergování lipidu ve vodném médiu, čištění výsledného liposomu a analýzu konečného produktu [38].

Mezi nejzákladnější metody přípravy částic patří metody mechanické disperze, kam řadíme sonikaci, hydrataci lipidového filmu, mikroemulgaci, membránové vytlačování a další. Níže

jsou popsány některé nejběžněji používané metody pro přípravu liposomů [38]. V experimentální části byla pak použita sonikační technika.

#### **2.7.3.1 Sonikace**

Sonikace je jednou z nejrozšířenějších metod pro přípravu malých unilamelárních vezikul (SUV). Existují dvě sonikační metody. Metoda využívající sonikátor typu vodní lázně a metoda využívající sonikační sondu [38].

#### **2.7.3.2 Příprava liposomů hydratací fosfolipidového filmu**

Metoda hydratace fosfolipidového filmu představuje nejjednodušší a nejstarší metodu používanou v liposomové technologii. Při této metodě jsou nejprve lipidy rozpuštěny ve vhodném organickém rozpouštědle a následně sušeny, čímž pak vzniká tenký film na dně baňky. Získaný lipidový film se hydratuje za použití vhodného vodného média za vzniku liposomální disperze. Strukturální uspořádání disperze může být ovlivněno hydratačními médii. Jemná hydratace fosfolipidového filmu vytváří obrovské unilamelární vezikuly (GULV), zatímco větší hydratace vede k tvorbě multilamelárních váčků (MUV) se špatnou homogenitou velikosti, což vyžaduje další krok, ve které se velikost sníží. Nejběžnější používané metody dimenzování zahrnují sonikaci, kdy pomocí vysoce účinného ultrazvuku se získají malé unilamelární váčky (SUV) [38].

#### **2.7.3.3 Odpaření v reverzní fázi**

Odpařování v reverzní fázi je alternativní metoda k metodě hydrataci filmu, která zahrnuje vytvoření emulze voda v oleji mezi vodnou a organickou fází. Pro homogenizaci systému je nutná krátká sonikace této směsi. Odstraněním organické fáze za sníženého tlaku se získá mléčný gel, který se následně promění v liposomální suspenzi [38].

### **2.8 Metody využívané k charakterizaci liposomů a enkapsulovaných látek**

#### **2.8.1 Stanovení enkapsulační účinnosti**

Při navrhování a vývoji liposomových částic je důležité kontrolovat poměr volného (neenkapsulovaného) a enkapsulovaného léčiva, tj. kontrolovat účinnost enkapsulace (EE) v liposomech. K samostatnému vyhodnocení zapouzdřeného a volného léčiva v liposomech jsou využívány sofistikované analytické techniky. Příkladem těchto technik je HPLC a UV-VIS spektrofotometrie [39].

##### **2.8.1.1 Spektrofotometrie**

Podstatou spektrometrických metod je sledování interakce elektromagnetického záření se zkoumanou látkou s cílem využít pozorovaných jevů pro důkaz látky, studium její struktury nebo stanovení její koncentrace. Základním hlediskem pro rozdělení spektrometrických metod je, zda dochází k absorpci nebo emisi záření látkou [40].

Absorpční spektrofotometrie je založena na schopnosti látky absorbovat záření určité vlnové délky, tj. určité energetické kvantum, posuzována je pak velikost a charakter této absorpce. V absorpčních metodách se pro účely kvantitativního hodnocení využívá vztahu mezi měřenou veličinou (zpravidla absorbancí  $A$ ), počtem částic  $N$  (absorbujících monochromatické záření) v jednotce objemu a tloušťkou absorbujícího prostředí  $l$ ,

$$A = \alpha_{\lambda} \cdot l \cdot N \quad 1)$$

kde  $\alpha_{\lambda}$  je konstanta nazývaná jako monochromatický absorpční koeficient. Tento vztah je nazýván (Bouguerovým-) Lambertovým-Beerovým zákonem [40].

### 2.8.2 Stanovení stability částic pomocí analýzy zeta potenciálu

Zeta potenciál je termín pro elektrokinetický potenciál v koloidních systémech a je měřítkem povrchového náboje. Částice mají na povrchu náboj, který přitahuje tenkou vrstvu protiiontů k povrchu částic (Sternova vrstva). Tato dvojitá vrstva iontů putuje s částicí, neboť se rozptýluje v celém roztoku. Zeta potenciál je potenciál na hranici této dvojité vrstvy. Velikost zeta potenciálu predikuje koloidní stabilitu roztoku. Stabilita koloidního systému závisí na rovnováze mezi dvěma působícími silami, van der Waalsovy a síle elektrické dvojvrstvě. Částice, které mají téměř neutrální zeta potenciál nebo mírně nabitý povrch, mají tendenci rychleji agregovat. Čím silnější je náboj, tím je lepší stabilita částic. Obecně jsou částice s hodnotami zeta potenciálu vyšším než 30 mV nebo méně než -30 mV označovány jako stabilní systémy [41, 42].

### 2.8.3 Dynamický rozptyl světla

Analyzovat velikost částic a distribuci částic v rozsahu velikostí je možné pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Jedná se o měření světelné interference založené na Brownově pohybu částic v suspenzi a korelaci jeho rychlosti s jeho velikostí pomocí Stokesovy-Einsteinovy rovnice. Rozsah distribuce velikostí částic je pak znázorněn jako index polydisperzity (PDI), který je výstupem autokolerační funkce [42].

## 2.9 Hydrogely

Hydrogely představují velice důležitou skupinu materiálů, které si získaly pozornost v posledních desetiletích zejména v biomedicínských aplikacích. Jsou velmi často využívány ve zdravotnictví, tkáňovém inženýrství a patří mezi systémy se schopností dodávání léčiv [43].

Z fyzikálně-chemického hlediska jsou definovány jako speciální systémy, jejichž struktura je tvořena trojrozměrnou polymerní sítí. Hydrogely mají vynikající schopnost zadržet velké množství vody (nabobtnat) nebo biologických tekutin bez porušení sítí. Jsou tedy vhodnými nosiči různých látek, a to pro jejich strukturální podobnost s extracelulární matrix, biologickou kompatibilitu a biologickou degradaci [43].

Přípravy hydrogelů lze dosáhnout změnou fyzikálních podmínek, jako je teplota, pH, tlak nebo iontová síla. Jiným způsobem přípravy je způsob chemickou cestou, resp. interakcí za vzniku trvalých spojení v polymerních sítích nebo prostřednictvím fyzikálních interakcí spletením polymerních řetězců, iontových interakcí anebo vodíkových vazeb. Nejběžnějšími polymerními látkami pro přípravu těchto nosičů je chitosan, celulóza, želatina a nejlépe směs těchto látek. Hydrogely lze jednoduše připravit jednoduše přímým smíšením polymerů s terapií. Široká škála léčiv, včetně malých molekul, peptidů, proteinů a kmenových buněk, je tedy vhodná pro začlenění do hydrogelů. Což umožňuje lokální podávání léčiv a tím i léčbu infekčních onemocnění [43].

### 2.9.1 Klasifikace hydrogelů

Klasifikace hydrogelů závisí na jejich fyzikálních vlastnostech, povaze bobtnání, způsobu přípravy, původu, iontových nábojích, zdroji, míře biodegradace a pozorované povaze zesítnění [44].

Klasifikace dle zdroje dělí hydrogely do dvou skupin na základě jejich přirozeného nebo syntetického původu. Hydrogely rozlišujeme také na základě jejich polymerního složení: na homopolymerní hydrogely, které jsou označeny jako polymerní síť odvozená od jediného druhu monomeru, na kopolymerní hydrogely skládající se ze dvou či více různých druhů monomerů a na multipolymerní interpenetrační polymerní hydrogel (IPN), který je vyroben ze dvou nezávislých zesítněných syntetických nebo přírodních polymerních složek. Klasifikace na základě typu zesíťování dělí hydrogely do dvou kategorií, a to na základě fyzikální nebo chemické povahy. Podle náboje jsou hydrogely klasifikovány do čtyř skupin: iontové (neutrální), iontové, amfoterní elektrolyty obsahující kyselé i bazické skupiny a zwitterionické obsahující aniontové i kationtové skupiny v každé strukturní opakující se jednotce [45].

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem této bakalářské práce byl návrh, příprava a charakterizace gelů s obsahem přírodní antimykotické složky. Za tímto účelem byly plněny následující úlohy:

1. Příprava a charakterizace vybraných rostlinných extraktů
2. Stanovení antimykotické aktivity připravených extraktů ve volné i enkapsulované formě a srovnání jejich účinků s antimykotickým léčivem
3. Návrh a testování antimykotického přípravku s obsahem přírodní antimykotické složky

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité mikroorganismy pro stanovení antimykotické aktivity

Během experimentální části této práce byla na testování antimykotické aktivity používána kvasinka *Candida glabrata* CCM 8270, která pochází z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

### 4.2 Použité chemikálie

#### 4.2.1 Použité chemikálie na přípravu extraktů

Ethanol, Sigma-Aldrich (SRN)

#### 4.2.2 Použité chemikálie na charakterizaci extraktů

ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt], Sigma-Aldrich (SRN)

Dusitan sodný- p.a., LachNer, (ČR)

Hydroxid sodný- p.a., LachNer, (ČR)

Chlorid hlinitý- p.a., LachNer, (ČR)

Etanol pro UV/VIS- p.a., LachNer, (ČR)

Folin-Ciocalteuovo činidlo - p.a., LachNer, (ČR)

Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)

Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (SRN)

Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)

Uhličitan sodný- p.a., LachNer, (ČR)

#### 4.2.3 Použité chemikálie na kultivaci kvasinky *Candida glabrata*

Agar, Himedia (India)

Glukóza- p.a., LachNer, (ČR)

Pepton aus Casein, Roth (SRN)

Yeast Extrakt Powder, Himedia (India)

#### 4.2.4 Použitá chemikálie jako standard

Klotrimazol, Sigma-Aldrich (SRN)

#### 4.2.5 Použité chemikálie na přípravu částic

Chloroform- p.a., LachNer, (ČR)

Cholesterol, Sigma-Aldrich (SRN)

Lecitin, Sigma-Aldrich (SRN)

#### 4.2.6 Použité chemikálie na přípravu gelu

Carbomer, Polygel CA, Miča a Harašta, s.r.o (ČR)

### 4.3 Použité přírodní materiály

Měsíček lékařský, bylinkářství Zelená apatyka (ČR)

Třapatka nachová, bylinkářství Zelená apatyka (ČR)

Tužebník jilmový, bylinkářství Zelená apatyka (ČR)  
Vilcacora, bylinkářství Zelená apatyka (ČR)

#### **4.4 Přístroje a pomůcky**

Analytické váhy, Boeco (SRN)  
Automatické pipety  
Centrifuga Boeco U-32, Hettich Zentrifugen (SRN)  
Centrifuga MiniSpin, Eppendorf (SRN)  
ELISA reader BioTek ELx808, Biotek (USA)  
Extraktor typu Soxhlet SOXTHERM, Gerhardt (SRN)  
Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)  
Magnetická míchačka s ohřevem, Benchmark Scientific (USA)  
Spektrofotometr NanoPhotometer, Implen (SRN)  
Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios Delta  
Mini Vortex Mixer WXMNFS, Ohaus (USA)  
Temperovaná třepačka Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)  
Temperovaná třepačka Heidolph Inkubator 1020, Labicom (ČR)  
Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonoplus HS3200, Sonorex Technik (SRN)  
Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML, IKA Werke (SRN)  
Laminární box Aura mini, Bioair (ITA)

#### **4.5 Příprava extraktů**

Byly připraveny celkem tři druhy extraktů: vodné, ethanolové a lipidické. Extrakty byly připraveny z těchto přírodních látek: měsíčku lékařského, třapatky nachové, tužebníku jilmového a vilcacory. Rovněž byly připraveny extrakty ze směsi těchto bylin, konkrétně: z třapatky nachové a tužebníku jilmového v poměru 3:2 a z třapatky nachové a vilcacory v poměru 4:1.

##### **4.5.1 Příprava vodných extraktů**

Pro přípravu vodných extraktů bylo použito 5 g sušiny přírodní látky. Navážka byla louhována ve 100 ml destilované vody na magnetické míchačce s vyhříváním (80 °C) po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly extrakty zcentrifugovány, zfiltrovány a uchovány ve zkumavkách typu Eppendorf.

##### **4.5.2 Příprava ethanolových extraktů**

Pro přípravu ethanolových extraktů bylo použito 5 g sušiny přírodní látky. Navážka byla louhována ve 100 ml 20% ethanolu na třepačce po dobu 24 hodin. Poté byly extrakty zcentrifugovány, zfiltrovány a uchovány ve zkumavkách typu Eppendorf.

##### **4.5.3 Příprava lipidických extraktů**

Do prázdných celulózových extrakčních patron bylo vždy naváženo 5 g sušiny přírodní látky. Extrakční patrony byly navrchu ucpány smotkem vaty a následně byly vloženy do drátěných držáků extrakčních nádob. Do extrakčních nádob bylo přidáno 120 ml extrakčního činidla (hexanu). Takto připravené extrakční nádoby byly vloženy do přístroje Gerhardt Soxtherm. Pomocí předem nastaveného programu, zvolených parametrů pro extrakci v hexanu



(viz. Tabulka 1), byla spuštěna extrakce. Celková doba extrakce byla nastavena na 3 hodiny a 4 minuty. Po skončení extrakce byly extrakční nádoby vyjmuty z přístroje, následně byl jejich obsah kvantitativně převeden do předem zvážených slzičkových baněk. Protože vzorky po extrakci obsahovaly velké množství hexanu, byly slzičkové baňky přeneseny na rotační vakuovou odparku, kde bylo rozpouštědlo postupně odpařeno. Poté byly slzičkové baňky opět zváženy a byl zaznamenán výtěžek extrakce. Získané lipidické extrakty byly uchovány v chladu ve zkumavkách typu Eppendorf.

**Tabulka 1** Parametry extrakce na přístroji Gerhardt Soxtherm

parametry extrakce v hexanu	
teplotní limit	300 °C
teplota extrakce	170 °C
redukční interval	3 min 30 s
redukční puls	3 s
fáze extrakce	1 h 30 min
vypařování A	5 x interval
doba oplachování	1 h 0 min
vypařování B	2 x interval
vypařování C	10 min
délka programu	3 h 4 min

## 4.6 Charakterizace extraktů

### 4.6.1 Spektrofotometrické stanovení celkových fenolických látek

Pro stanovení celkových fenolických látek byla použita metoda, která využívá jejich reakce s Folin-Ciocaltauovým činidlem za vzniku barevného produktu, kdy intenzita tohoto zbarvení je měřena spektrofotometricky.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml 10x zředěného Folin-Ciocaltauova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl extraktu vzorku. Roztok byl promíchán a ponechán 5 minut k inkubaci při laboratorní teplotě. Poté byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Roztok byl opět promíchán a ponechán 15 minut stát. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti blanku (kde namísto vzorku byla přidána destilovaná voda).

Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí kalibrační řady kyseliny gallové v rozmezí koncentrací 0,2 až 0,6 mg/ml. Obsah celkových fenolických látek ve vzorku byl vypočten z kalibrační rovnice  $y = 1,149 x$ .

### 4.6.2 Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů

Ke stanovení celkových flavonoidů se využívá spektrofotometrická metoda s hlinitou solí a dusitanem.

Do zkumavky bylo vždy napipetováno 0,5 ml extraktu vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Roztok byl poté promíchán a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Dále bylo do zkumavky přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Roztok byl opět promíchán a ponechán 5 minut stát. Nakonec bylo přidáno 1,5 ml roztoku

hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách stání byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti blanku, kterým byla destilovaná voda.

Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí kalibrační řady katechinu v rozmezí koncentrací 0,03 až 0,3 mg/ml. Obsah celkových flavonoidů ve vzorku byl vypočten z kalibrační rovnice  $y = 2,7374 x$ .

#### **4.6.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS**

Celková antioxidační aktivita připravených extraktů byla stanovena metodou využívající radikál-kation ABTS<sup>•+</sup>.

Roztok ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Pro získání radikálového kationtu z ABTS byl roztok smíchán s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Roztok byl poté ponechán 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

Před použitím byl připravený zásobní roztok ABTS<sup>•+</sup> zředěn ethanolem pro UV/VIS na absorbanci  $0,70 \pm 0,02$  při vlnové délce 734 nm. Měření bylo provedeno proti ethanolu pro UV/VIS.

Pro měření byla použita zúžená kyveta, do níž byl napipetován 1 ml ABTS<sup>•+</sup> a 10  $\mu$ l extraktu vzorku. Vzorek byl promíchán a uchován ve tmě. Po 10 minutách byl zaznamenán pokles absorbance. Blank byl připraven z 1 ml ABTS<sup>•+</sup> a 10  $\mu$ l destilované vody.

Pro kalibraci byla vytvořena koncentrační řada Troloxu v rozmezí od 50 do 400  $\mu$ l/ml. Standard Trolox byl předem rozpuštěn v 60% ethanolu. Celková antioxidační aktivita byla pak vypočtena z této kalibrační rovnice:  $y = 0,0014 x$ .

### **4.7 Příprava liposomových částic**

Liposomy byly připraveny metodou sonikace, pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru. Byly připraveny ze všech druhů testovaných extraktů (z vodných, ethanolových a lipidických extraktů).

#### **4.7.1 Příprava liposomů z vodných extraktů**

Do sady kádinek bylo vždy naváženo 10 mg cholesterolu a 90 mg sójového lecitinu (poměr 1:9), následně byl k této směsi přidán 1 ml vodného extraktu a 9 ml destilované vody. Tato směs byla v kádince sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru po dobu 1 minuty v deseti sekundových intervalech, tak aby nedošlo k nadměrnému zahřívání vzorku. Kádinka byla rovněž při sonikaci vložena do misky s vodou, aby bylo zabráněno tomuto zahřívání. Připravené liposomové částice byly slity do čistých zkumavek a uchovávány v chladu (při 5 °C).

#### **4.7.2 Příprava liposomů z ethanolových extraktů**

Liposomy z ethanolových extraktů byly připraveny stejným postupem jako liposomy z vodných extraktů (viz. 4.7.1). Připravené liposomy byly rovněž slity do čistých zkumavek a uchovány v chladu (teplota 5 °C)

#### **4.7.3 Příprava liposomů z lipidických extraktů**

Pro tvorbu liposomových částic z lipidických extraktů byl použit chloroform jako rozpouštědlo.

Do sady kádinek bylo vždy naváženo 10 mg cholesterolu a 90 mg sójového lecitinu, k této směsi bylo přidáno 10 ml destilované vody. Dále bylo vždy v 1 ml chloroformu rozpuštěno

10 mg lipidického extraktu. Tento rozpuštěný lipidický extrakt byl následně přidán do kádinky s obsahem vody, cholesterolu a lecitinu. Směs v kádince byla sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru. Sonikace probíhala 1 minutu v deseti sekundových intervalech, tak jako tomu při přípravě liposomů z vodných a ethanolových extraktů. Po sonikaci byly kádinky s připravenými částicemi vloženy na magnetickou míchačku, kde byly ponechány po dobu úplného odpaření chloroformu. Připravené liposomy byly slity do čistých zkumavek a uchovávány v chladu (teplota 5 °C).

#### **4.7.4 Příprava liposomů s komerčně dostupným léčivem**

Jako komerčně dostupné léčivo pro testování antimykotické aktivity byl zvolen lék klotrimazol.

Pro přípravu liposomů s klotrimazolem bylo nejprve nutné toto léčivo rozpustit v ethanolu, kdy pro rozpuštění 10 mg klotrimazolu byl použit 1 ml 96% ethanolu. Dále bylo do kádinky naváženo 10 mg cholesterolu a 90 mg sójového lecitinu, k této směsi byl přidán 1 ml rozpuštěného léčiva a 9 ml destilované vody. Směs byla sonikována tyčovým ultrazvukovým homogenizátorem po dobu 1 minuty v deseti sekundových intervalech. Po sonikaci byly připravené částice slity do čisté zkumavky a opět uchovány v chladu (teplota 5 °C).

### **4.8 Charakterizace liposomových částic**

U připravených liposomů byla analyzována enkapsulační účinnost, velikost, index polydisperzity a také zeta potenciál neboli stabilita částic.

#### **4.8.1 Stanovení enkapsulační účinnosti**

Z připravených liposomů byl odebrán 1 ml do zkumavky typu Eppendorf. Roztoky byly centrifugovány po dobu 5 minut (14 000 ot./min), z důvodu usazení největších částic. Supernatant byl slit do nové čisté zkumavky typu Eppendorf a byl opět centrifugován, centrifugace probíhala po dobu 60 minut (11 000 ot./min). Dále byl supernatant slit a k precipitátu byl přidán 1 ml sterilní vody.

Enkapsulační účinnost (%) byla stanovena na základě stanovení celkového obsahu polyfenolů (viz. 4.6.1) v odebraném supernatantu. Byla vypočtena jako podíl neenkapsulované složky k celkovému množství složky v původním roztoku.

#### **4.8.2 Stanovení velikosti a distribuce částic**

Stanovení velikosti a distribuce částic bylo provedeno pomocí DLS přístroje Malvern Zetasizer. U každého typu liposomů byl koeficient polydisperzity a samotná velikost částic zaznamenány celkem třikrát.

#### **4.8.3 Stanovení stability částic**

Stanovení stability částic bylo provedeno pomocí měření zeta potenciálu na přístroji Malvern Zetasizer, kdy do Dip cely byl umístěn připravený roztok s částicemi. Cella byla vložena do přístroje a byl zaznamenán zeta potenciál (pro každý typ liposomů třikrát). Z hodnoty zeta potenciálu byla určena stabilita částic. Částice s hodnotou zeta potenciálu menší než -30 mV a větší než 30 mV byly zhodnoceny jako stabilní.

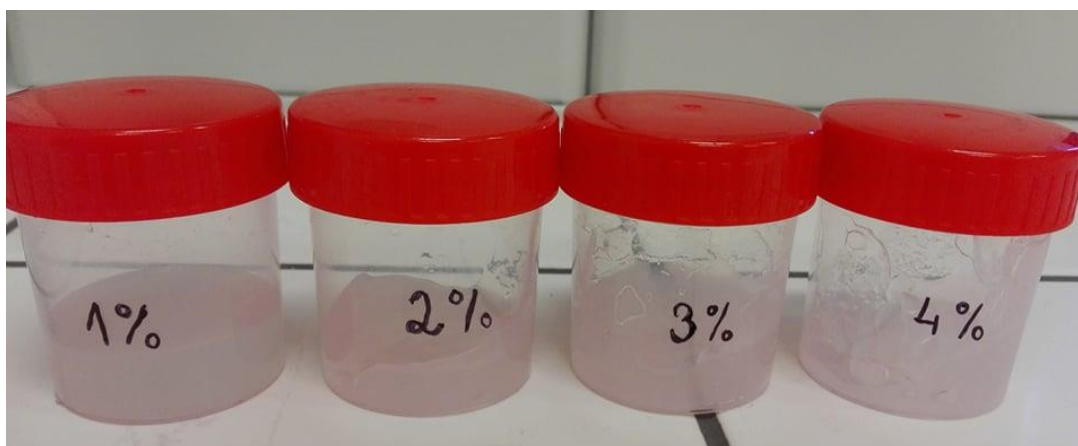
#### 4.9 Příprava výsledného produktu

Výsledným produktem této práce je gel s obsahem přírodní složky vykazující antimykotický účinek. Byly tedy připraveny celkem čtyři druhy gelu, které se liší obsahem těchto přírodních složek. Pro inkorporaci přírodních látek do gelů byly vybrány extrakty, u kterých byla prokázána antimykotická aktivita, a u kterých byl stanoven vyšší obsah aktivních látek. Byly vybrány jak extrakty ve volné, tak i enkapsulované formě.

Gely byly připraveny ze dvou složek, z carbomeru a destilované vody. Pro určení optimální konzistence gelu byly připraveny čtyři druhy gelu, každý o různé koncentraci carbomeru.

Nejprve bylo do kádinky naváženo takové množství carbomeru a destilované vody, aby carbomer hmotnostně tvořil 1 %, 2 %, 3 % a 4 % (viz. Obrázek 1). Navážené množství carbomeru a destilované vody bylo mícháno do vzniku gelu.

Gely s obsahem antimykotické látky byly připraveny tak, aby přidaná látka (extrakt, liposom s enkapsulovaným extraktem) hmotnostně tvořila 10 % z celkového množství připraveného gelu. Konkrétní složení připravených gelů je zaznamenáno v tabulce 2.



**Obrázek 1** Připravené gely o různé koncentraci carbomeru

**Tabulka 2** Složení jednotlivých gelů

složka gelu	gel č.1	gel č.2	gel č.3	gel č.4
	množství [g]			
carbomer	0,40	0,40	0,40	0,40
destilovaná voda	8,60	8,60	8,60	8,60
liposomy s vodným extraktem z tužebníku jilmového	0,50	–	–	–
liposomy s vodným extraktem z vilcacory	0,50	–	–	–
liposomy s lipidickým extraktem z tužebníku jilmového	–	1,00	–	–
liposomy s lipidickým extraktem z vilcacory	–	–	1,00	–
lipidický extrakt z měsíčku lékařského	–	–	–	1,00



**Obrázek 2** Gely s obsahem aktivních látek; zleva gel č.1, gel č.2, gel č.3 a gel č.4

## 4.10 Testování antimykotické aktivity

Antimykotická aktivita připravených extraktů, částic a konečných produktů byla testována na kvasince *Candida glabrata*. Kvasinka byla nakultivována na tekutém médiu (viz. 4.10.1).

### 4.10.1 Příprava živného média a kultivace kvasinky *Candida glabrata*

Tekuté živné médium bylo vždy připravováno do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Složení a potřebné množství chemikálií na přípravu živného média je uvedeno v tabulce 3. Odvážené množství surovin bylo doplněno do 50 ml destilovanou vodou. Médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci po dobu 45 minut při teplotě 120 °C.

Po vychladnutí bylo inokulum kultury *Candida glabrata* zaočkováno z Petriho misky do připraveného tekutého živného média. Kultivace probíhala 24 hodin na třepačce vytemperované na teplotu 37 °C. Po uplynutí 24 hodin byl odebrán 1 ml inokula do dalšího tekutého média, se kterým byl proveden antimykotický test.

**Tabulka 3** Složení tekutého živného média pro *Candida glabrata*

složka	množství
glukóza	1 g
Pepton aus Casein	1 g
Yeast Extract Powder	0,5 g
destilovaná voda	50 ml

### 4.10.2 Testování antimykotické aktivity diluční metodou

Tento antimykotický test byl proveden na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Do jamek bylo vždy napipetováno 150 µl kultury s buňkami *Candida glabrata* a 50 µl vzorku antimykotické látky (extraktu nebo liposomů). Blank, nutný pro sledování růstu kvasinky, byl připraven ze 150 µl kultury buněk zředěné 50 µl rozpouštědla (rozpouštědlo, které bylo použito na přípravu extraktu). Antimykotická aktivita byla stanovena spektrofotometricky pomocí ELISA readeru. Byla změřena absorbance v čase 0 a po 24 hodinách kultivace při vlnové délce 630 nm.

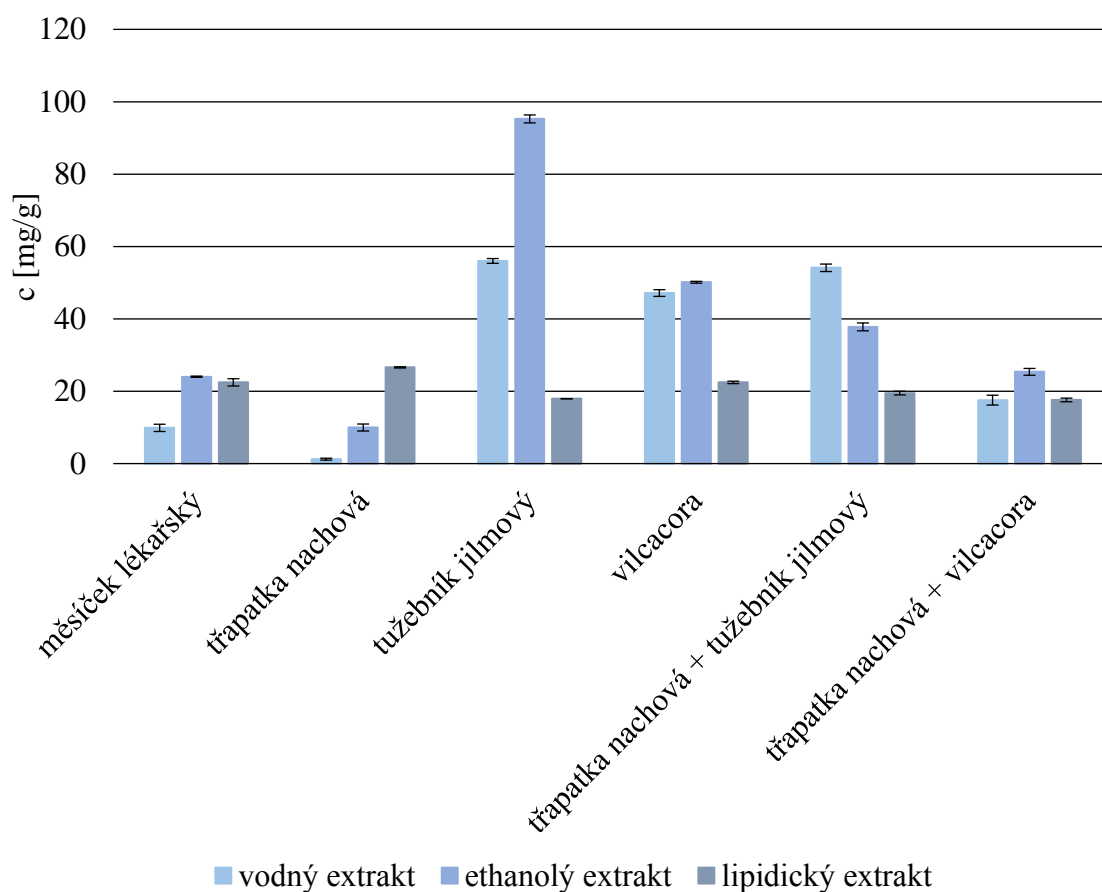
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Všeobecná charakteristika extraktů

Všeobecná charakteristika extraktů zahrnuje stanovení celkových fenolických látek, flavonoidů a celkové antioxidační aktivity jednotlivých extraktů. Tato stanovení byla provedena u vodných, ethanolových i lipidických extraktů připravených dle postup uvedeném v kapitole 4.5.

#### 5.1.1 Celkový obsah fenolických látek v jednotlivých extraktech

Stanovení celkových fenolických látek bylo provedeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1. Obsah polyfenolů v jednotlivých extraktech je znázorněn v následujícím grafu (Obrázek 3) a uveden v tabulce 4. Každý z extraktů byl analyzován celkem třikrát, výsledkem je pak průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou z těchto tří měření (v mg polyfenolů na g sušiny přírodní látky).



**Obrázek 3** Grafické znázornění množství celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech

**Tabulka 4** Množství celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech

druh extraktu	Vodný	ethanolový	lipidický
přírodní látka	c [mg/g]		
měsíček lékařský	9,87 ± 1,00	24,01 ± 0,17	22,44 ± 1,00
třapatka nachová	1,22 ± 0,27	9,96 ± 0,97	26,58 ± 0,17
tužebník jilmový	56,00 ± 0,66	95,25 ± 1,10	17,94 ± 0,00
vilcacora	47,12 ± 0,92	50,11 ± 0,25	22,44 ± 0,33
třapatka nachová + tužebník jilmový	54,12 ± 1,03	37,78 ± 1,09	19,48 ± 0,50
třapatka nachová + vilcacora	17,54 ± 1,36	25,35 ± 0,95	17,59 ± 0,50

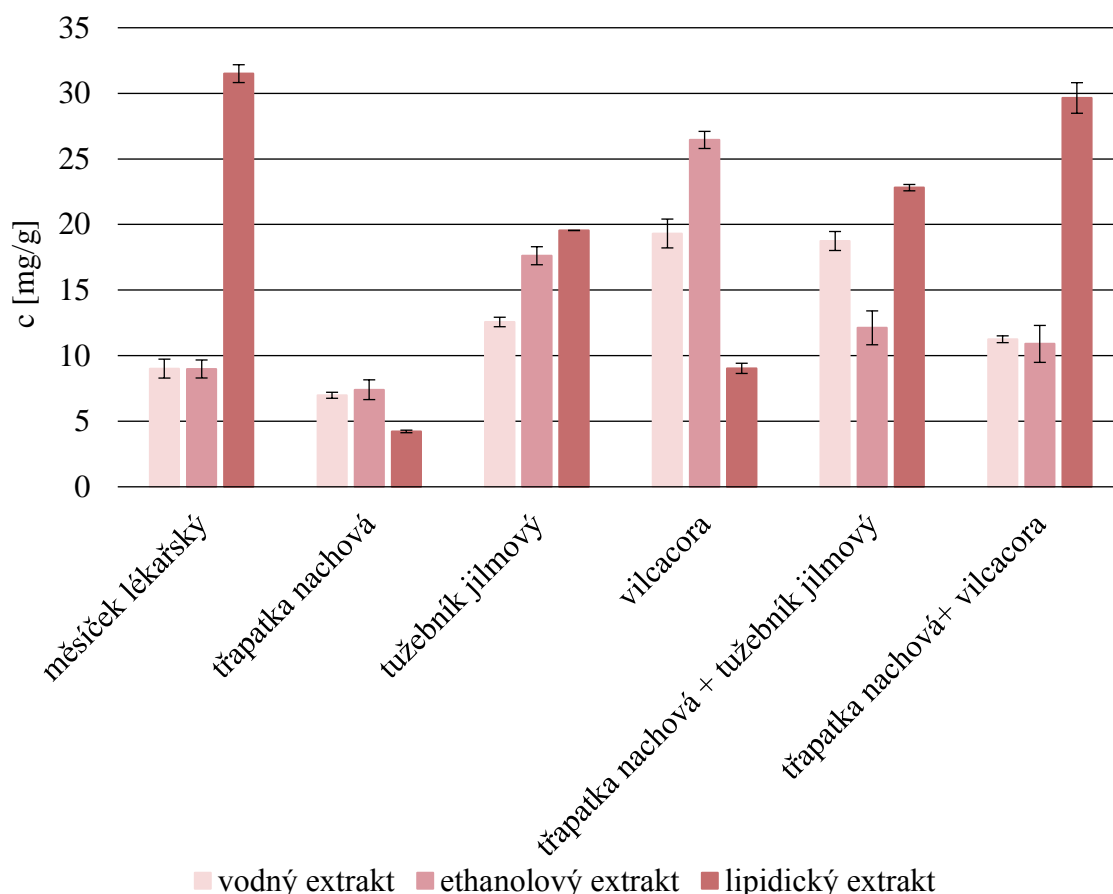
Z hlediska obsahu fenolických látek byly jako nejbohatší vyhodnoceny vodné a ethanolové extrakty. Výjimku však tvořil lipidický extrakt třapatky nachové, kde byl obsah polyfenolů, ve srovnání s jinými extrakty tohoto vzorku, nejvyšší.

Co se týče vodných extraktů, nejvíce fenolických látek bylo zaznamenáno u extraktu z tužebníku jilmového, dále u extraktu směsi bylin, kde jednou ze složek byl právě tužebník jilmový, druhou složkou této směsi byla třapatka nachová, která naopak v samotné formě obsahovala nejméně fenolických látek. Dalším v pořadí s největším množstvím uvolněných fenolických látek do vodného roztoku byla vilcacora a následně vilcacora ve směsi s třapatkou nachovou.

U vybraných vzorků bylo extrahováno rovněž velké množství fenolických látek do roztoku s 20% ethanolom. U ethanolového extraktu bylo největší zastoupení těchto aktivních látek stanoveno opět u tužebníku jilmového, kdy tento extrakt obsahoval až 95,25 mg polyfenolů na g sušiny této byliny. Množství fenolů ethanolových extraktů dále klesalo v pořadí vilcacora, směs třapatky a tužebníku, směs třapatky a vilcacory, měsíček a třapatka.

### 5.1.2 Celkový obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno dle postupu, který je uveden v kapitole 4.6.2. Obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech je znázorněn v následujícím grafu (Obrázek 4) a uveden v tabulce 5. Každý z extraktů byl analyzován třikrát, výsledkem je průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou z těchto tří měření (v mg flavonoidů na g sušiny přírodní látky).



**Obrázek 4** Grafické znázornění množství flavonoidů v jednotlivých extraktech

**Tabulka 5** Množství flavonoidů v jednotlivých extraktech

druh extraktu	vodný	ethanolový	Lipidický
přírodní látka	c [mg/g]		
měsíček lékařský	9,01 ± 0,72	8,98 ± 0,69	31,50 ± 0,68
třapatka nachová	6,98 ± 0,23	7,40 ± 0,75	4,22 ± 0,10
tužebník jilmový	12,57 ± 0,36	17,62 ± 0,69	19,54 ± 0,00
vilcacora	19,31 ± 1,10	26,45 ± 0,65	9,03 ± 0,39
třapatka nachová + tužebník jilmový	18,74 ± 0,72	12,12 ± 1,29	22,81 ± 0,24
třapatka nachová + vilcacora	11,25 ± 0,26	10,89 ± 1,41	29,64 ± 1,17

Z uvedených hodnot je patrné, že nejvíce flavonoidů bylo zaznamenáno v lipidických extraktech. Výjimky zde tvoří třapatka nachová a vilcacora, které uvolnily více flavonoidů do vodného prostředí a do prostředí s ethanolom. Nejvíce flavonoidů u lipidických extraktů bylo stanoveno ve vzorku měsíčku lékařského, dále ve vzorcích směsí třapatky nachové s vilcacorou a následně s tužebníkem jilmovým a poté ve vzorku tužebníku jilmového.

Přestože flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu sloučenin řadících se mezi polyfenolické látky, byl vzhledem k poměrně vysokému obsahu polyfenolických látek (viz. 5.1.1) stanoven překvapivě nižší obsah flavonoidů (především u vodných a ethanolových extraktů). Zejména

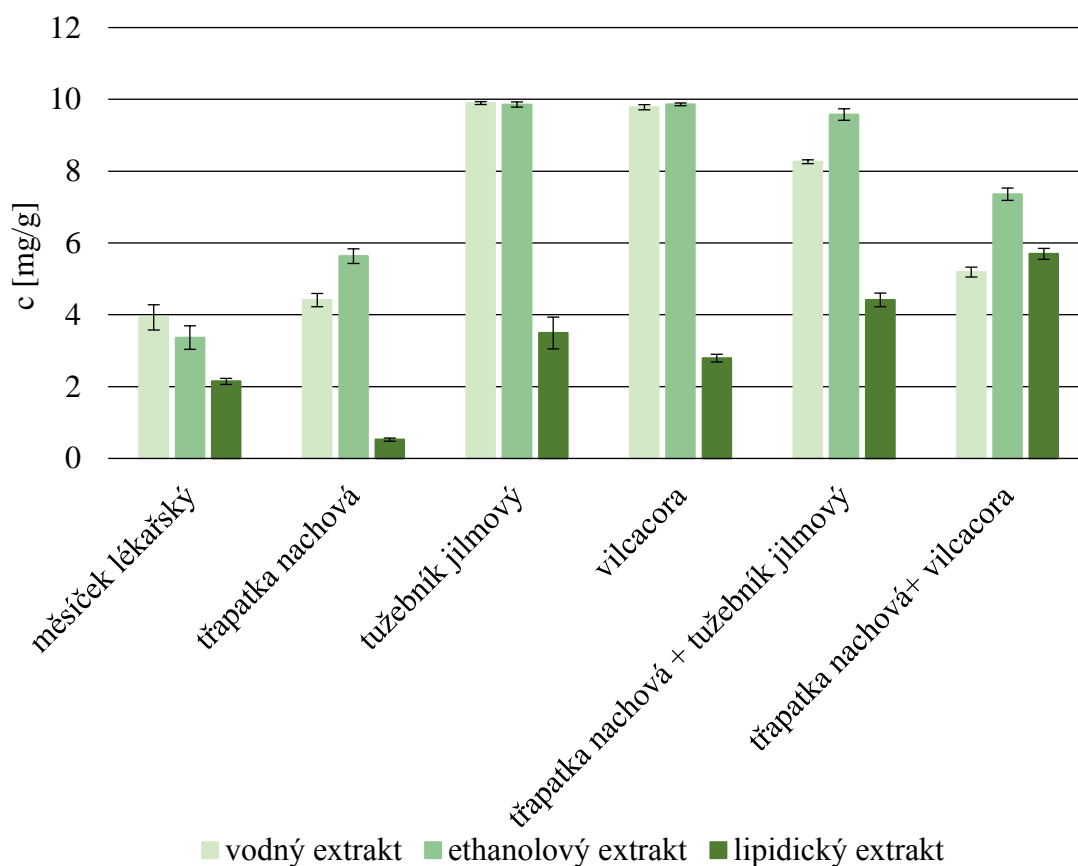


nižší hodnoty těchto látek byly prokázány u vodných a ethanolových extraktů tužebníku jilmového a vilcacory.

Stejně jako v případě stanovení celkových fenolů ve vodných a ethanolových extraktech byl i obsah flavonoidů zaznamenán u vzorků tužebníku jilmového, vilcacory a následně směsí obsahujících jednu z těchto dvou bylin.

### 5.1.3 Celková antioxidační aktivita jednotlivých extraktů

Celková antioxidační aktivita byla stanovena dle postupu, který je uveden v kapitole 4.6.3. Celková antioxidační aktivita jednotlivých extraktů je znázorněna v následujícím grafu (Obrázek 5) a uvedena v tabulce 6. Každý z extraktů byl analyzován třikrát, výsledkem je průměrná hodnota se směrodatnou z těchto tří měření (v mg na g sušiny přírodní látky).



**Obrázek 5** Grafické znázornění antioxidační aktivity jednotlivých extraktů

**Tabulka 6** Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů

druh extraktu	vodný	ethanolový	lipidický
přírodní látka	c [mg/g]		
měsíček lékařský	3,93 ± 0,35	3,37 ± 0,33	2,14 ± 0,08
třapatka nachová	4,41 ± 0,18	5,63 ± 0,20	0,52 ± 0,04
tužebník jilmový	9,90 ± 0,04	9,86 ± 0,07	3,49 ± 0,44
vilcacora	9,78 ± 0,07	9,86 ± 0,04	2,79 ± 0,11
třapatka nachová + tužebník jilmový	8,26 ± 0,05	9,58 ± 0,16	4,41 ± 0,19
třapatka nachová + vilcacora	5,19 ± 0,14	7,36 ± 0,17	5,70 ± 0,15

Největší antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky vodných a ethanolových extraktů tužebníku jilmového a vilcacory, stejně jako tomu bylo u předešlého stanovení celkových fenolických látek. Hodnoty u těchto dvou typů extraktů klesaly v pořadí tužebník jilmový, vilcacora, směs třapatky nachové a tužebníku jilmového, směs třapatky nachové a vilcacory, třapatka nachová a měsíček lékařský.

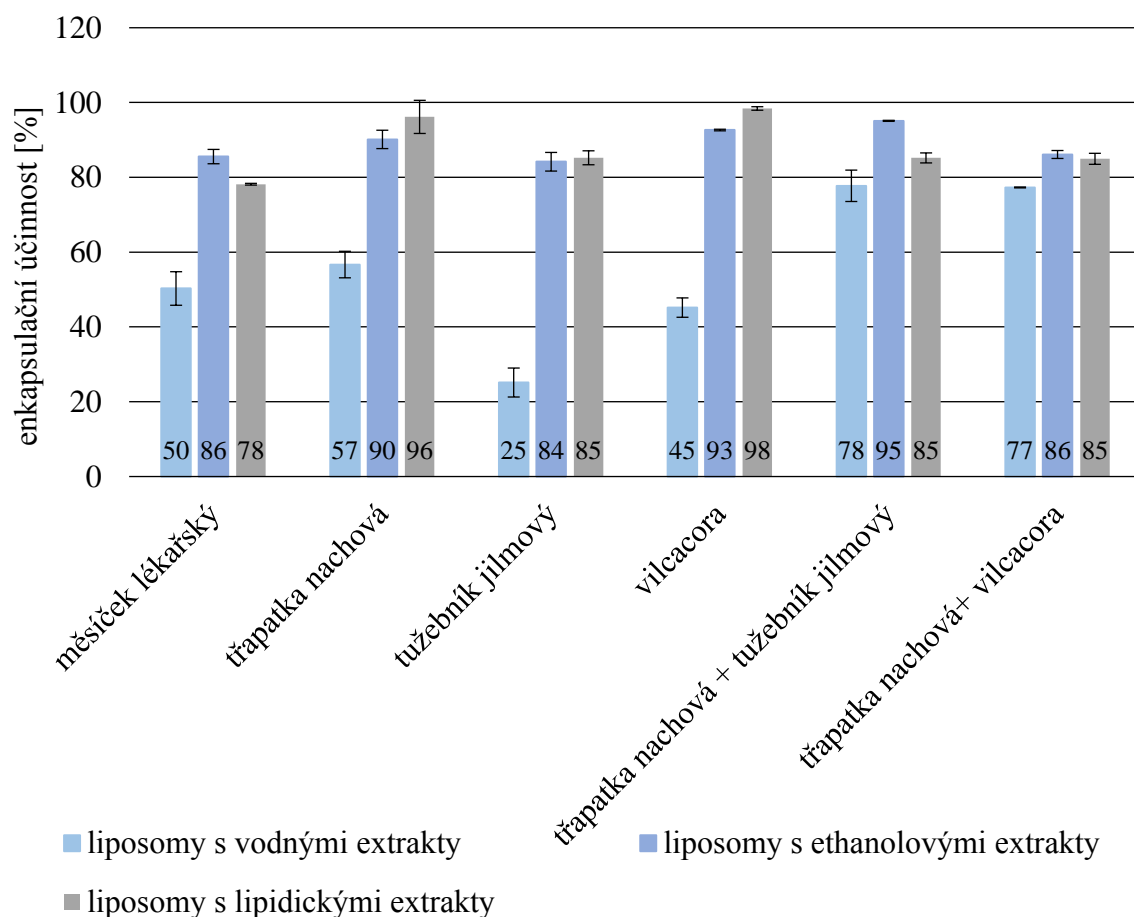
U lipidických extraktů nejlepší antioxidační potenciál byl prokázán u směsi bylin, konkrétně směsi tvořené třapatkou nachovou a vilcacorou. Směs, kde na místo vilcacory byl použit tužebník jilmový, vykazovala o něco menší antioxidační účinek. Naopak nejmenší hodnoty antioxidační aktivity byla stanoveny u lipidického extraktu samotné třapatky nachové.

## 5.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Účinnost enkapsulace aktivních složek do liposomových částic byla vypočtena na základě postupu uvedeném v kapitole 4.8.1. Stanovení enkapsulační účinnosti bylo provedeno spektrofotometricky a měření pro každý vzorek bylo provedeno třikrát. Výsledky procentuální enkapsulační účinnosti jsou znázorněny graficky (viz. Obrázek 6).

Z výsledků je patrné, že účinnost enkapsulace vodných extraktů do liposomů byla ve srovnání s ostatními druhy extraktů nižší. U vodných extraktů se účinnost pohybovala v rozmezí 20-80 % v závislosti na typu vzorku. V porovnání typů vzorků u vodných extraktů, nejlepší enkapsulační účinnost vykazovaly vzorky připravené ze směsí bylin.

Co se týče liposomů připravených z ethanolových extraktů, bylo zjištěno, že s použitím tohoto rozpouštědla se účinnost u některých vzorků výrazně navyšuje. Příkladem je vzorek liposomů obsahující extrakt z tužebníku jilmového, kdy vodný extrakt této byliny vykazoval pouze 25% účinnost a ethanolový až 84% enkapsulační účinnost. Při použití lipidických extraktů k enkapsulaci do liposomů tomu bylo podobně jako u liposomů s ethanolovými extrakty. Enkapsulační účinnost s lipidickými extrakty výrazně stoupla oproti vodným extraktům.



**Obrázek 6** Grafické znázornění enkapsulační účinnosti [%]

### 5.3 Stanovení velikosti liposomů

Průměrná velikost a index polydisperzity u připravených liposomů byl stanoven podle postupu uvedeném v kapitole 4.8.2. Všechny vzorky byly měřeny celkem třikrát, výsledky jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8, jako průměrné hodnoty měření.

**Tabulka 7** Průměrná velikost liposomových částic

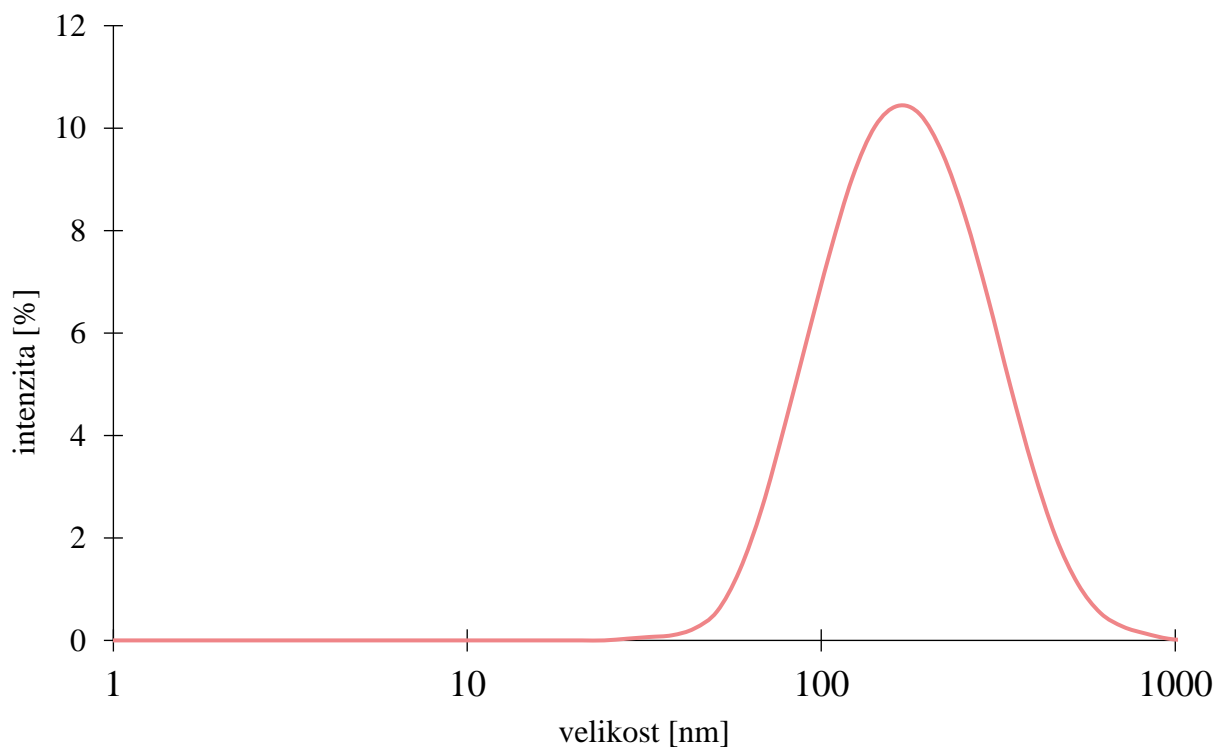
druh extraktu	vodný	ethanolový	lipidický
přírodní látka	velikost [nm]		
měsíček lékařský	322,2 ± 5,4	208,6 ± 2,7	185,0 ± 1,0
třapatka nachová	440,4 ± 9,9	182,5 ± 2,8	172,0 ± 2,9
tužebník jilmový	244,9 ± 1,3	153,5 ± 1,2	149,4 ± 1,5
vilcacora	292,0 ± 2,0	251,4 ± 3,2	174,8 ± 0,7
třapatka nachová + tužebník jilmový	195,9 ± 1,2	288,5 ± 6,1	146,5 ± 1,1
třapatka nachová + vilcacora	229,8 ± 0,9	149,7 ± 1,0	139,8 ± 1,0

**Tabulka 8** Indexy polydisperzity liposomových částic

druh extraktu	vodný	ethanolový	lipidický
přírodní látka	index polydisperzity [-]		
měsíček lékařský	$0,43 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$
třapatka nachová	$0,40 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$
tužebník jilmový	$0,32 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$
vilcacora	$0,33 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,00$
třapatka nachová + tužebník jilmový	$0,25 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,00$
třapatka nachová + vilcacora	$0,24 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$

Z tabulky 7 je patrné, že většina připravených částic se pohybovala v průměru mezi 100 a 300 nm. U liposomů obsahujících vodný extrakt z třapatky nachové byla naměřena velikost o něco vyšší (440 nm). Hodnoty liposomových částic tedy nepřekročily hodnotu 500 nm a proto lze nalézt možnost jejich uplatnění v oblasti kosmetiky.

Co se týče hodnot polydisperzních indexů (PdI) (viz. Tabulka 8), nejmenší hodnoty byly naměřeny u liposomů připravených z lipidických extraktů, tyto částice vykazují tedy největší uniformitu. U všech druhů připravených liposomů se hodnoty PdI pohybují v rozmezí hodnot od 0,20 do 0,40. Hodnota 0,40 byla překročena pouze u liposomů, kde enkapsulovanou složkou byl vodný extrakt měsíčku lékařského, což už značí větší polydisperzitu dané částicové suspenze.



**Obrázek 7** Grafické znázornění intenzivní distribuce velikosti částic vzorku liposomů obsahujících vodný extrakt tužebníku jilmového

## 5.4 Stanovení stability liposomů

Elektrokinetická stabilita liposomových částic byla stanovena ihned po jejich přípravě, dle postupu uvedeném v kapitole 4.8.3. Měření každého vzorku připravených částic bylo provedeno celkem třikrát, v tabulce 9 jsou uvedeny průměrné hodnoty zeta potenciálů z těchto tří měření, včetně směrodatných odchylek.

**Tabulka 9** Hodnoty zeta potenciálů liposomových částic

druh extraktu	vodný	ethanolový	lipidický
přírodní látka	zeta potenciál [mV]		
měsíček lékařský	$-34,3 \pm 2,9$	$-33,6 \pm 4,3$	$-35,6 \pm 1,0$
třapatka nachová	$-43,0 \pm 3,6$	$-120,0 \pm 9,9$	$-36,1 \pm 5,1$
tužebník jilmový	$-30,2 \pm 7,8$	$-143,0 \pm 7,2$	$-34,3 \pm 3,0$
Vilcacora	$-33,5 \pm 2,3$	$-117,3 \pm 8,8$	$-27,5 \pm 1,1$
třapatka nachová + tužebník jilmový	$-39,0 \pm 3,3$	$-142,3 \pm 9,9$	$-28,6 \pm 1,9$
třapatka nachová + vilcacora	$-40,7 \pm 4,1$	$-138,3 \pm 7,1$	$-21,5 \pm 1,6$

Obecně platí, že částice s hodnotami ležícími v intervalu hodnot  $-30$  a  $30$  mV jsou považovány za nestabilní. Z tabulky 9 je zřejmé, že všechny liposomové částice s enkapsulovanými vodnými, ethanolovými i lipidickými extrakty mohou být dle hodnot zeta potenciálů označeny jako stabilní, vyjímaje liposomů připravených z lipidických extraktů směsí bylin třapatky nachové a tužebníku jilmového, třapatky nachové a vilcacory a liposomů s lipidickým extraktem vilcacory. Co se týče vzorku liposomů obsahujících vodný extrakt z tužebníku jilmového, vzorek lze považovat za méně stabilní, neboť jeho hodnota zeta potenciálu těsně přesáhla hranici stability ( $-30,2$  mV). Naopak za velmi stabilní částice lze považovat vzorky liposomů s enkapsulovanými ethanolovými extrakty, kdy jejich absolutní hodnoty zeta potenciálů přesáhly až  $100$  mV.

## 5.5 Testování antimykotické aktivity

K posouzení antimykotického účinku připravených preparátů (extraktů ve volné formě, částic s enkapsulovanými extrakty a gelů) byla zvolena diluční metoda. Testování bylo provedeno na kvasince *C. glabrata* dle postupu uvedeném v kapitole 4.10.2.

Výsledná účinnost inhibice růstu kmene *C. glabrata* [%] je značena symboly uvedenými v tabulce 10.

**Tabulka 10** Znaky pro daná procenta antimykotického účinku

inhibice [%]	znak
0	–
0-25	+
25-50	++
50-75	+++
75-100	++++

### 5.5.1 Testování antimykotické aktivity připravených extraktů

V následujících tabulkách je znázorněn antimykotický účinek vodných, ethanolových a lipidických extraktů.

Z tabulky 11 lze vyčíst, že vodný extrakt měsíčku lékařského nevykazoval žádnou inhibici, extrakt třapatky nachové vykazoval alespoň částečný antimykotický účinek. Vyšší účinnost proti růstu buněk kvasinky *C. glabrata* byla zaznamenána u ostatních vodných extraktů.

**Tabulka 11** Antimykotický účinek vodných extraktů

přírodní látka	antimykotický účinek
měsíček lékařský	–
třapatka nachová	+
tužebník jilmový	++
vilcacora	++
třapatka nachová + tužebník jilmový	++
třapatka nachová + vilcacora	++

Z výsledků uvedených v tabulce 12 je patrné, že v případě použití extrakce do ethanolového roztoku byl prokázán antimykotický efekt u všech vzorků bylin. Nejvyšší antimykotická účinnost u tohoto typu extraktů byla vyhodnocena u extraktu z měsíčku lékařského a vilcacory.

**Tabulka 12** Antimykotický účinek ethanolových extraktů

přírodní látka	antimykotický účinek
měsíček lékařský	++
třapatka nachová	+
tužebník jilmový	+
vilcacora	++
třapatka nachová + tužebník jilmový	+
třapatka nachová + vilcacora	+

Co se týče lipidických extraktů (Tabulka 13), všechny testované vzorky vykazovaly antimykotickou aktivitu. Vyšší inhibiční účinek buněk byl zaznamenán u extraktu tužebníku jilmového, vilcacory a směsi třapatky nachové a tužebníku jilmového. Ostatní testované lipidické extrakty vykazovaly alespoň částečný antimykotický účinek.

**Tabulka 13** Antimykotický účinek lipidických extraktů

přírodní látka	antimykotický účinek
měsíček lékařský	+
třapatka nachová	+
tužebník jilmový	++
vilcacora	++
třapatka nachová + tužebník jilmový	++
třapatka nachová + vilcacora	+

### 5.5.2 Testování antimykotické aktivity připravených částic

V níže uvedených tabulkách 14, 15, 16 a 17 je znázorněn antimykotický účinek připravených prázdných liposomových částic a liposomových částic s enkapsulovanými vodnými, ethanolovými a lipidickými extrakty.

Jak je zřejmé z tabulky 14, prázdné liposomy nevykazovaly žádnou inhibiční účinnost vůči kvasince *C. glabrata*.

**Tabulka 14** Antimykotický účinek prázdných liposomů

	antimykotický účinek
prázdné liposomy	–

Z výsledků uvedených v tabulce 15 je patrné, že antimykotický efekt byl pozorován u všech vzorků liposomů obsahujících vodný extrakt. U liposomů s tímto druhem extraktu byl pozorován alespoň částečný inhibiční účinek na buňky kmenu kvasinky *C. glabrata*. Tato nižší inhibiční účinnost liposomů je přisuzována nízkému obsahu aktivní látky (extraktů) v těchto částicích, resp. naředěním extraktu velkým množstvím vody při přípravě částic (ředěno 10x).

**Tabulka 15** Antimykotický účinek liposomů s vodnými extrakty

přírodní látka	antimykotický účinek
měsíček lékařský	+
třapatka nachová	+
tužebník jilmový	+
vilcacora	+
třapatka nachová + tužebník jilmový	+
třapatka nachová + vilcacora	+

U liposomů s ethanolovými (viz. Tabulka 16) a lipidickými (viz. Tabulka 17) extrakty byl rovněž zaznamenán nižší inhibiční účinek (pouze do 25 %). Žádnou antimykotickou aktivitu nevykazovaly částice s obsahem ethanolového extraktu připraveného ze směsi třapatky nachové a vilcacory a částice s obsahem lipidického extraktu třapatky nachové a opět směsi třapatky nachové a vilcacory.

**Tabulka 16** Antimykotický účinek liposomů s ethanolovými extrakty

přírodní látka	antimykotický účinek
měsíček lékařský	+
třapatka nachová	+
tužebník jilmový	+
vilcacora	+
třapatka nachová + tužebník jilmový	+
třapatka nachová + vilcacora	–

**Tabulka 17** Antimykotický účinek liposomů s lipidickými extrakty

přírodní látka	antimykotický účinek
měsíček lékařský	+
třapatka nachová	–
tužebník jilmový	+
vilcacora	+
třapatka nachová + tužebník jilmový	+
třapatka nachová + vilcacora	–

## 5.6 Testování antimykotické aktivity komerčně dostupného léčiva

Pro srovnání antimykotického účinku vybraných přírodních produktů s antimykotickým léčivem, bylo provedeno testování antimykotické aktivity u komerčně dostupného léčiva klotrimazol. Toto léčivo bylo testováno jak ve volné, tak i enkapsulované formě.

Klotrimazol byl testován z hlediska antimykotického účinku opět diluční bujónovou metodou (viz. 4.10.2). Testování bylo provedeno o různých koncentracích klotrimazolu. Léčivo bylo naředěno tzv. dvojkovou řadou – každá následující koncentrace je poloviční než koncentrace předchozí. Výchozí koncentrací klotrimazolu byla koncentrace 10 000 µg/ml. Výsledky účinnosti inhibice buněk kvasinky *C. glabrata* tímto léčivem jsou zaznamenány v tabulce 18.

Z tabulky 18 je zřejmé, že i po několikanásobném zředění, klotrimazol působil fungicidně, resp. inhibice buněk kvasinky byla 100%. I při menší koncentraci léčiva (312,5 µg/ml) byl potvrzen antimykotický účinek. V případě enkapsulovaného klotrimazolu do liposomů (postup enkapsulace viz. 4.7.4), byl zaznamenán menší inhibiční účinek ve srovnání s volnou formou léčiva (viz. Tabulka 19).

Pro zajímavost, co se týče přípravků s obsahem klotrimazolu, které jsou volně dostupné na trhu a určené k léčbě kožních infekcí způsobenými patogenními houbami, 1 g takového přípravku (např. krému) obsahuje 10 mg tohoto léčiva, tj. 1%.

**Tabulka 18** Antimykotický účinek klotrimazolu ve volné formě

koncentrace klotrimazolu [µg/ml]	antimykotický účinek
10 000,0	++++
5 000,0	++++
2 500,0	++++
1 250,0	++++
625,0	++++
312,5	+

**Tabulka 19** Antimykotický účinek klotrimazolu v enkapsulované formě

	antimykotický účinek
liposomy s klotrimazolem (1 000 µg/ml)	+



## 5.7 Testování antimykotické aktivity výsledného produktu

V tabulce 20 je uveden antimykotický účinek připravených gelů jakožto výsledných produktů této práce. Testování antimykotické aktivity gelů bylo provedeno rovněž diluční metodou (viz. 4.10.2) a opět na kvasince *C. glabrata*.

Ze čtyř připravených gelů, nejlepší antimykotický účinek byl prokázán u gelu č.4. U ostatních připravených gelů byla zaznamenána nižší inhibiční účinnost růstu buněk kvasinky. Vyšší antimykotická aktivita gelu č.4 ve srovnání s ostatními gely je přisuzována obsahu oleje z měsíčku lékařského, který byl do gelu aplikován ve volné formě. Ostatní připravené gely obsahovaly extrakty pouze v enkapsulované formě, resp. enkapsulované do liposomových částic. Už samotné připravené liposomy vykazovaly jen částečnou inhibici (viz. 5.5.2), proto u těchto gelů nebyla očekávána příliš vysoká antimykotická aktivita.

**Tabulka 20** Antimykotický účinek připravených gelů

gel	antimykotický účinek
gel č.1	+
gel č.2	+
gel č.3	–
gel č.4	++

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium antimykotických vlastností rostlinných extraktů a liposomových částic s obsahem těchto extraktů. Cílem práce bylo navrhnout a připravit gel obsahující tyto přírodní složky, který je účinný proti mykotickému onemocnění. Jako zdroje molekul s antimykotickou aktivitou byly na základě dostupných literárních údajů vybrány rostliny bohaté na biologicky aktivní látky, konkrétně měsíček lékařský, třapatka nachová, tužebník jilmový a vilcacora.

V úvodní části práce byly ze zmíněných rostlin a jejich kombinací připraveny celkem tři druhy extraktů: vodné, ethanolové (20% ethanol) a lipidické. Připravené extrakty byly charakterizovány z hlediska obsahu celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity. Pomocí spektrofotometrického stanovení bylo zjištěno, že nejvíce fenolických látek bylo uvolněno z tužebníku jilmového do vodného a ethanolem tvořeného prostředí. Vyšší množství celkových fenolických látek bylo rovněž zaznamenáno u vodného a ethanolového extraktu z vilcacory. Co se týče stanovení celkových flavonoidů v daných extraktech, nejvíce těchto látek bylo zjištěno u lipidických extraktů, zejména u extraktu z měsíčku lékařského a u extraktů připravených ze směsí bylin (směs třapatky nachové s tužebníkem jilmovým a třapatky nachové s vilcacorou). Celková antioxidační aktivita byla nejvyšší u vodných a ethanolových extraktů z tužebníku jilmového a vilcacory, tak jako tomu bylo u stanovení celkového obsahu fenolických látek.

V další části práce byly všechny připravené extrakty použity na přípravu liposomových částic s enkapsulovanou aktivní složkou. Liposomy byly připraveny metodou sonikace pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru. Částice byly testovány z hlediska enkapsulační účinnosti, velikosti a stability pomocí elektrokinetického potenciálu. Bylo stanoveno, že účinnost enkapsulace aktivních složek do liposomových částic byla znatelně vyšší u ethanolových a lipidických extraktů, ve srovnání s vodnými extrakty. Průměrná velikost částic se pohybovala v rozmezí 100 až 300 nm. Z hlediska stability částic, liposomy vykazovaly velmi dobrou stabilitu, zejména extrakty s obsahem ethanolu. Výjimku však tvořily liposomy obsahující lipidický extrakt z měsíčku lékařského a připravených směsí.

U připravených extraktů a liposomů byl testován antimykotický účinek vůči kvasince *Candida glabrata*. Pro testování byla zvolena diluční metoda. Měřením provedeným pomocí ELISA readeru bylo zjištěno, že všechny připravené extrakty částečně inhibují růst buněk kvasinky. U některých vzorků byla stanovena vyšší antimykotická aktivita, příkladem jsou všechny druhy extraktů z vilcacory (inhibice buněk z 25 až 50 %). Výjimku tvořil pouze vodný extrakt měsíčku lékařského, u kterého nebyla prokázána žádná antimykotická aktivita. Liposomové částice s enkapsulovanými extrakty vykazovaly jen částečnou antimykotickou aktivitu, u některých vzorků však nebyla prokázána žádná inhibiční účinnost. Důvodem nízké antimykotické účinnosti liposomů je naředění enkapsulovaných extraktů.

Antimykotický účinek byl také pro srovnání stanoven u komerčně dostupného antimykotického léčiva. Pro toto stanovení bylo vybráno léčivo klotrimazol, u kterého byl stanoven inhibiční účinek vůči buňkám kvasinky rodu *Candida* ve volné i enkapsulované formě. Antimykotický test, opět provedený diluční metodou, prokázal až fungicidní účinnost tohoto léčiva. U léčiva enkapsulovaného do liposomových částic byla naopak prokázána nižší antimykotická aktivita ve srovnání s volnou formou klotrimazolu.

V závěru experimentální části práce byl připraven antimykotický produkt, kterým byl gel. Byly připraveny celkem čtyři druhy gelu lišící se ve složení inkorporované látky. Extrakty, které byly aplikovány do gelů, byly zvoleny na základě stanovení obsahu aktivních látek a stanovení antimykotické účinnosti. Extrakty byly použity jak ve volné, tak i enkapsulované formě. Následně byl u připravených gelů proveden antimykotický test, kdy nejvyšší inhibiční účinnost byla vyhodnocena u gelu s obsahem lipidického extraktu měsíčku lékařského. U ostatních gelů byla účinnost nižší, neboť tyto gely obsahovaly extrakty pouze v enkapsulované formě, přičemž už u samotných liposomů nebyla stanovena příliš vysoká antimykotická aktivita. Výhoda použití liposomů jako prostředků k enkapsulaci extraktů či léčiv spočívá především ve schopnosti řízeného uvolňování dané látky, proto byly částice zvoleny.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BEDNÁŘ, Marek, Věra FRANĚKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- [2] JAREŠOVÁ, Lucie. Povrchové kožní mykózy a péče o pokožku postiženou plísni. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2016, 1. dubna 2016, **10**(1), 20-23 [cit. 2020-01-16]. ISSN 1803-5337. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2016/01/05.pdf>
- [3] REBOLLO, N., A.P. LÓPEZ-BARCENAS a R. ARENAS. Tinea Capitis. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* [online]. 2008, **99**(2), 91-100 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/S1578-2190(08)70208-7. ISSN 15782190. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1578219008702087>
- [4] HUBE, B., R. HAY, J. BRASCH, S. VERALDI a M. SCHALLER. Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. *Journal de Mycologie Médicale* [online]. 2015, **25**(1), e44-e58 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.11.002. ISSN 11565233. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523314003023>
- [5] GHOSH, SudipKumar, SunilKumar DEY, Indranil SAHA, JayasreeNath BARBHUIYA, Arghyaprasun GHOSH a AlokeKumar ROY. Pityriasis versicolor: A clinicomycological and epidemiological study from a tertiary care hospital. *Indian Journal of Dermatology* [online]. 2008, **53**(4) [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.4103/0019-5154.44791. ISSN 0019-5154. Dostupné z: <http://www.e-ijd.org/text.asp?2008/53/4/182/44791>
- [6] PAPPAS, Peter G., Carol A. KAUFFMAN, David R. ANDES, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* [online]. [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1093/cid/civ933. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ933>
- [7] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN isbn80-902896-6-5.
- [8] RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina a Malcolm D. RICHARDSON. Systemic fungal infections. *Medicine* [online]. 2017, **45**(12), 757-762 [cit. 2020-01-17]. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.09.007. ISSN 13573039. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303917302475>
- [9] HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. 2., přeprac. vyd. V Praze: Triton, 2001. ISBN isbn80-7254-181-1.
- [10] PARK, No-Hee, Ki-Hyuk SHIN a Mo K. KANG. Antifungal and Antiviral Agents. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 488-503 [cit. 2020-01-17]. DOI: 10.1016/B978-0-323-39307-2.00034-5. ISBN 9780323393072. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323393072000345>
- [11] TEVYASHOVA, Anna N., Evgenia N. OLSUFYEVA, Svetlana E. SOLOVIEVA, et al. Structure-Antifungal Activity Relationships of Polyene Antibiotics of the Amphotericin

- B Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, **57**(8), 3815-3822 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1128/AAC.00270-13. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00270-13>
- [12] GALLAGHER, James J., Natalie WILLIAMS-BOUYER, Cynthia VILLARREAL, John P. HEGGERS a David N. HERNDON. Treatment of infection in burns. *Total Burn Care* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 136-176 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1016/B978-1-4160-3274-8.50015-5. ISBN 9781416032748. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416032748500155>
- [13] BRIK, Harry. *Natamycin* [online]. Elsevier, 1981, 1981, s. 513-561 [cit. 2020-01-18]. Analytical Profiles of Drug Substances. DOI: 10.1016/S0099-5428(08)60650-4. ISBN 9780122608100. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099542808606504>
- [14] PAPICH, Mark G. Griseofulvin. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 367-368 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1016/B978-0-323-24485-5.00290-4. ISBN 9780323244855. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323244855002904>
- [15] GUBBINS, Paul O. a Elias J. ANAISSIE. Antifungal therapy. *Clinical Mycology* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 161-195 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1016/B978-1-4160-5680-5.00007-4. ISBN 9781416056805. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416056805000074>
- [16] ARANGO AC, Mesa, Bueno SÁNCHEZ JG a Betancur GALVIS LA. Natural products with antimycotic activity. *Rev Esp Quimioter* [online]. 2004, **17**(4), 325-31 [cit. 2020-01-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696222>
- [17] FOROUTANKHAH, Marjan, Majid TOGHYANI a Nasir LANDY. Evaluation of *Calendula officinalis* L. (marigold) flower as a natural growth promoter in comparison with an antibiotic growth promoter on growth performance, carcass traits and humoral immune responses of broilers. *Animal Nutrition* [online]. 2019, **5**(3), 314-318 [cit. 2019-12-08]. DOI: 10.1016/j.aninu.2019.04.002. ISSN 24056545. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405654518303056>
- [18] KORBELÁŘ, Jaroslav a Zdeněk ENDRIS. *Naše rostliny v lékárenství*. Sedmé vydání. Avicentrum, Praha: Zdravotnické nakladatelství, 1981. ISBN 80-201-009-1.
- [19] GAZIM, Zilda Cristiane, Claudia Moraes REZENDE, Sandra Regina FRAGA, Terezinha Inez Estivaleti SVIDZINSKI a Diógenes Aparicio Garcia CORTEZ. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2008, **39**(1), 61-63 [cit. 2019-12-08]. DOI: 10.1590/S1517-83822008000100015. ISSN 1517-8382. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822008000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- [20] KARG, Cornelia A., Pengyu WANG, Angelika M. VOLLMAR a Simone MOSER. Re-opening the stage for Echinacea research - Characterization of phylloxanthobilins as a novel anti-oxidative compound class in *Echinacea purpurea*. *Phytomedicine* [online]. 2019, **60** [cit. 2019-12-08]. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152969. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711319301370>

- [21] SAEIDNIA, Soodabeh, Azadeh MANAYI a Mahdi VAZIRIAN. Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2015, **9**(17) [cit. 2019-12-08]. DOI: 10.4103/0973-7847.156353. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2015/9/17/63/156353>
- [22] HARBOURNE, Niamh, Eunice MARETE, Jean Christophe JACQUIER a Dolores O'RIORDAN. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2009, **42**(9), 1468-1473 [cit. 2019-12-09]. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.05.005. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643809001297>
- [23] WAWER, I. Solid-State Measurements of Drugs and Drug Formulations. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 201-231 [cit. 2019-12-09]. DOI: 10.1016/B978-0-444-53173-5.00009-3. ISBN 9780444531735. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444531735000093>
- [24] BINA, Fatemeh, Samaneh SOLEYMANI, Tayebah TOLIAT, Mannan HAJIMAHMOODI, Malihe TABARRAI, Mohammad ABDOLLAHI a Roja RAHIMI. Plant-derived medicines for treatment of endometriosis: A comprehensive review of molecular mechanisms. *Pharmacological Research* [online]. 2019, **139**, 76-90 [cit. 2019-12-09]. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.11.008. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661818311800>
- [25] CHANDRA, Priyanka, Rakesh KUMAR SHARMA a Daljit SINGH ARORA. Antioxidant compounds from microbial sources: a review. *Food Research International* [online]. 2019 [cit. 2019-12-10]. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108849. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919307355>
- [26] PANCHE, A. N., A. D. DIWAN a S. R. CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* [online]. 2016, **5** [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1017/jns.2016.41. ISSN 2048-6790. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S2048679016000410/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S2048679016000410/type/journal_article)
- [27] BELŠČAK-CVITANOVIĆ, Ana, Ksenija DURGO, Ana HUĐEK, Višnja BAČUN-DRUŽINA a Draženka KOMES. Overview of polyphenols and their properties. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 3-44 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4. ISBN 9780128135723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128135723000014>
- [28] CORY, Hannah, Simone PASSARELLI, John SZETO, Martha TAMEZ a Josiemer MATTEI. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* [online]. 2018, **5** [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.3389/fnut.2018.00087. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2018.00087/full>
- [29] SCORZONI, Liliana, Tatiane BENADUCCI, Ana Marisa Fusco ALMEIDA, Dulce Helena Siqueira SILVA, Vanderlan da Silva BOLZANI a Maria José Soares Mendes GIANINNI. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian*

- Journal of Microbiology* [online]. 2007, **38**(3), 391-397 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1590/S1517-83822007000300001. ISSN 1517-8382. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822007000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- [30] AKIMSHEVA, E.Yu., E.S. DOLININA a E.V. PARFENYUK. Interactions of sol-gel encapsulated acyclovir with silica matrix. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2019, **178**, 103-110 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.052. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776519301341>
- [31] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1) [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [32] VAN TRAN, Vinh, Ju-Young MOON a Young-Chul LEE. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, **300**, 114-140 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.03.003. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365919301415>
- [33] MAGARKAR, Aniket, Vivek DHAWAN, Paraskevi KALLINTERI, Tapani VIITALA, Mohammed ELMOWAFY, Tomasz RÓG a Alex BUNKER. Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution. *Scientific Reports* [online]. 2015, **4**(1) [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1038/srep05005. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep05005>
- [34] YEAGLE, Philip L. The Lipids of Biological Membranes. *The Membranes of Cells* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 27-56 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800047-2.00002-4. ISBN 9780128000472. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128000472000024>
- [35] BUDAI, Livia. Liposomes for Topical Use: A Physico-Chemical Comparison of Vesicles Prepared from Egg or Soy Lecithin. *Scientia Pharmaceutica* [online]. 2013, **81**(4), 1151-1166 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.3797/scipharm.1305-11. ISSN 00368709. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2218-0532/81/4/1151>
- [36] SZUHAJ, B.F. PHOSPHOLIPIDS | Properties and Occurrence. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, 2003, s. 4514-4519 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00915-9. ISBN 9780122270550. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X009159>
- [37] KAPALKA, George M. Tic Disorders. *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 291-315 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374927-7.00010-8. ISBN 9780123749277. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749277000108>
- [38] ISALOMBOTO NKANGA, Christian, Alain MURHIMALIKA BAPOLISI, Nnamdi IKEMEFUNA OKAFOR a Rui WERNER MAÇEDO KRAUSE. General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. CATALA, Angel, ed. *Liposomes - Advances and Perspectives* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-9-4 [cit.

- 2020-02-09]. DOI: 10.5772/intechopen.84255. ISBN 978-1-78984-494-8. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/liposomes-advances-and-perspectives/general-perception-of-liposomes-formation-manufacturing-and-applications>
- [39] OHNISHI, Naozumi, Eiichi YAMAMOTO, Hiromasa TOMIDA, Kenji HYODO, Hiroshi ISHIHARA, Hiroshi KIKUCHI, Kohei TAHARA a Hirofumi TAKEUCHI. Rapid determination of the encapsulation efficiency of a liposome formulation using column-switching HPLC. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **441**(1-2), 67-74 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.12.019. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312010745>
- [40] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN isbn80-246-0776-x.
- [41] GUMUSTAS, Mehmet, Ceyda T. SENDEL-TURK, Aysen GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN a Bengi USLU. Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 67-108 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8. ISBN 9780323527255. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323527255000058>
- [42] KUMAR, Ajeet a Chandra Kumar DIXIT. Methods for characterization of nanoparticles. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 43-58 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1. ISBN 9780081005576. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005576000031>
- [43] WANG, Qianwen, Zhong ZUO, Cheuk Kit Chucky CHEUNG a Sharon Shui Yee LEUNG. Updates on thermosensitive hydrogel for nasal, ocular and cutaneous delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2019, **559**, 86-101 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.030. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517319300651>
- [44] ULLAH, Faheem, Muhammad Bisyrul Hafi OTHMAN, Fatima JAVED, Zulkifli AHMAD a Hazizan Md. AKIL. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2015, **57**, 414-433 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.053. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115302393>
- [45] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>



## **8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
DLS	dynamic light scattering
EE	encapsulation efficiency
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GULV	gigant unilamellar vesicle
HPLC	high performance liquid chromatography
IPN	interpenetrating polymer network
LUV	large unilamellar vesicle
MIC	minimum inhibitory concentration
MLV	multilamellar vesicle
MUV	medium-size unilamellar vesicle
PDI	polydispersity index
SUV	small unilamellar vesicle